

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Šarić

Morfološke i molekularno-filogenetske značajke roda
Branchiobdella Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) u Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu evoluciju i taksonomiju životinja i Laboratoriju za ekotoksikologiju Zoologijskog zavoda, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. Ivane Maguire i red. prof. Gorana Klobučara, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvala

Najveće zahvale idu mojim mentorima, izv. prof. Ivani Maguire i prof. Goranu Klobučaru. Hvala što ste mi povjerili ovakvu temu za izradu diplomskog rada i bili mi podrška.

Izv. prof. Ivani Maguire htjela bih posebno zahvaliti što mi je pomogla savladati sve korake u diplomskom- od morfološke determinacije, preko rada u laboratoriju i analize dobivenih podataka. Hvala na pristupačnosti i poticanju (kada se činilo da nikada neću izaći iz podrumskog laboratorija). Također, hvala što ste me uključili u organizaciju CrayCro kongresa jer me taj događaj inspirirao i potaknuo na daljnji rad u znanosti.

Isto tako htjela bih se zahvaliti dr.sc. Anamariji Štambuk i dr.sc. Maji Šrut na strpljivoj pomoći i savjetima oko laboratorijskog dijela diplomskog. Bez Vaše pomoći, izrada bi trajala puno puno duže. Hvala i Mišelu Jeliću na svim savjetima. Puno hvala dr.sc. Martini Podnar što me naučila provoditi računalne analize sekvenci i strpljivo odgovarala na sva moja pitanja (a bilo ih je).

Također bih zahvalila prof. Mladenu Kučiniću na lupi i prof. Zlatku Liberu što mi je nanofotometar uvijek bio na raspolaganju.

Hvala Mariji Č. na pomoći oko izolacije branhiobdela. Lada J. i Nikola K. najveće vam hvala na svim savjetima i podršci oko diplomskog! Hvala Martini C. na svemu što smo proživjele skupa tokom srednje škole i fakulteta. Hvala i Dorotei P., Nikoli H. i Nikoli K. što smo na Korani osnovali našu „Sekciju za rakove“.

Hvala Davoru, koji ne studira biologiju, ali me toliko morao slušati da je upoznat sa cjelokupnom biologijom branhiobdela. Hvala Mirni, koja ne studira biologiju i nikako da zapamti čime se bavim, ali uvijek je tu da podrži. Hvala i mojim ostalim „ne-biolozima“ na podršci tokom izrade ovog diplomskog rada.

I na kraju, zaista hvala mojim dragim roditeljima i sestri. Vas troje ste mi bili, i uvijek ćete biti, najveća podrška.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Morfološke i molekularno-filogenetske značajke roda *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) u Hrvatskoj

Ivana Šarić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Branhiobdele su skupina holarktički rasprostranjenih malih kolutićavaca koji žive kao epibionti na slatkovodnim rakovima iz porodica Astacidae i Cambaridae. U Hrvatskoj nalazimo šest vrsta branhiobdela, koje sve pripadaju rodu *Branchiobdella*, te žive kao epibionti na vrstama rakova *Austropotamobius pallipes*, *Austropotamobius torrentium* i *Astacus astacus*. Cilj ovog istraživanja bio je morfološka determinacija vrsta branhiobdela s rakova iz roda *Austropotamobius* te utvrđivanje molekularno-filogenetskih odnosa između vrsta branhiobdela. Na rakovima roda *Austropotamobius* sa 74 lokaliteta utvrđene su sljedeće vrste branhiobdela: *Branchiobdella astaci*, *Branchiobdella hexodonta*, *Branchiobdella parasita*, *Branchiobdella pentodonta* i *Branchiobdella italica*. Utvrđeno je 50 novih lokaliteta na kojima su pronađene branhiobdele na rakovima roda *Austropotamobius* u Hrvatskoj. Molekularno-filogenetski odnosi između vrsta roda *Branchiobdella* u Hrvatskoj utvrđeni su genskim markerima za podjedinicu 1 citokrom C oksidaze (COI) i 16S rRNA. Analizom odnosa između i unutar pojedinih taksona na filogenetskom stablu i pomoću izračuna p-distanci, zaključeno je kako je moguće da su procesi koji su doveli do specijacije unutar roda *Austropotamobius* također utjecali i na specijaciju samih branhiobdela.

(54 stranice, 22 slike, 16 tablica, 72 literaturna navoda, 8 priloga, jezik izvornika:

hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Austropotamobius*, branhiobdele, epibionti, p-distance, rasprostranjenost, COI, 16S rRNA

Voditelji: Dr. sc. Ivana Maguire, izvr. prof. i Dr. sc. Goran Klobučar, red. prof.
Neposredni voditelj: Dr. sc. Anamaria Štambuk

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Maguire, izvr. prof.
Dr. sc. Mirta Tkalec, izvr. prof.
Dr. sc. Duje Lisičić, doc.

Rad prihvaćen: 06.06.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Morphology and molecular phylogeny of the genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Croatia

Ivana Šarić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Branchiobdellidans are ectosymbiotic annelids that are primarily associated with freshwater crayfish from the Astacidae and Cambaridae families. They have a Holarctic distribution. Six species of branchiobdellidans have been reported in Croatia, all of them belong to the *Branchiobdella* genus. Three native Croatian species of crayfish have been reported as hosts: *Austropotamobius pallipes*, *Austropotamobius torrentium* and *Astacus astacus*. The objectives of this research were to morphologically identify the branchiobdellidan species living on crayfish from the *Austropotamobius* genus and to infer a molecular phylogeny between them. The examination of crayfish from 74 water body sites revealed the existence of five branchiobdellidan species: *Branchiobdella astaci*, *Branchiobdella hexodonta*, *Branchiobdella parasita*, *Branchiobdella pentodonta* and *Branchiobdella italica*. Branchiobdellidan presence has been identified in fifty new locations in Croatia. Nucleotide sequences of two mitochondrial genes (COI and 16S rRNA) have been used to estimate phylogenetic relationships between the species from the genus *Branchiobdella*. The results of the phylogenetic analyses, based on the examination of the constructed phylogenetic trees and values of p-distances, indicate that the same process that led to the speciation of the genus *Austropotamobius* in Croatia, also caused the speciation of studied branchiobdellidans.

(54 pages, 22 figures, 16 tables, 72 references, 8 supplementary data, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Austropotamobius*, branchiobdellidans, distribution, epibionts, p-distance, COI, 16S rRNA

Supervisors: Dr. Ivana Maguire, Assoc. Prof. and Dr. Goran Klobučar, Prof.

Assistant supervisor: Dr. Anamaria Štambuk

Reviewers: Dr. Ivana Maguire, Assoc. Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 06.06.2014.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opće značajke branhiobdela.....	1
1.2. Sistematika i evolucija branhiobdela.....	3
1.3. Branhiobdele u Hrvatskoj i Europi.....	4
1.4. Filogenija.....	7
1.5. Molekularna filogenija	8
1.6. Filogenetsko stablo.....	9
2. CILJEVI	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Uzorkovanje branhiobdela	12
3.2. Izolacija i morfološka determinacija branhiobdela	12
3.3. Izolacija DNA.....	14
3.4. Umnažanje, pročišćavanje i sekvenciranje DNA	14
3.5. Računalne analize nukleotidnih sekvenci.....	17
3.5.1. Nukleotidne sekvence korištene u molekularno-filogenetskoj analizi.....	17
3.5.2. Sravnjivanje nukleotidnih sekvenci	17
3.5.3. Filogenetske analize sravnjenih sekvenci	19
3.5.4. Genetske udaljenosti nukleotidnih sekvenci	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Izolirane i morfološki determinirane branhiobdele	21
4.2. Izolirana i umnožena DNA.....	29
4.3. Računalne analize nukleotidnih sekvenci.....	31
4.3.1. Nukleotidne sekvence korištene u molekularno-filogenetskoj analizi.....	31
4.3.2. Sravnjene nukleotidne sekvence	34
4.3.3. Filogenetske analize sravnjenih sekvenci	34
4.3.4. Genetske udaljenosti nukleotidnih sekvenci	37
5. RASPRAVA.....	39
5.1. Morfološka determinacija i rasprostranjenost roda <i>Branchiobdella</i>	39
5.2. Molekularna filogenija roda <i>Branchiobdella</i>	41
5.3. Genetske udaljenosti unutar roda <i>Branchiobdella</i>	44
6. ZAKLJUČAK	46
7. LITERATURA.....	47
8. PRILOZI.....	54
9. ŽIVOTOPIS	55

POPIS KRATICA

A, T, C, G	▪ adenin, timin, citozin, gvanin; nukleotidi
BA	▪ Bayesian analiza
BIC	▪ Bayesian informacijski kriterij (<i>Bayesian Information Criterion</i>)
BLAST	▪ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
COI	▪ podjedinica 1 citokrom C oksidaze
DNA	▪ deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	▪ deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	▪ etilendiamintetraoctena kiselina
kb	▪ kilobaza
ML	▪ metoda najveće vjerojatnosti (<i>Maximum Likelihood</i>)
MP	▪ metoda najveće štedljivosti (<i>Maximum Parsimony</i>)
mtDNA	▪ mitohondrijska DNA
NCBI	▪ <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	▪ metoda susjednog sparivanja (<i>Neighbor Joining</i>)
pb	▪ parova baza
PCR	▪ lančana reakcija polimerazom (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
p-distance	▪ udvojene distance (<i>pairwise distance</i>)
RNA	▪ ribonukleinska kiselina
rRNA	▪ ribosomalna RNA
TAE	▪ tris-acetat-EDTA
Tris-HCl	▪ tris(hidroksimetil)aminometan-hidroklorid
UV	▪ ultraljubičasto

1. UVOD

1.1. OPĆE ZNAČAJKE BRANHIOBDELA

Branhiobdele su skupina malih kolutićavaca koji žive kao epibionti na slatkovodnim rakovima iz porodica Astacidae i Cambaridae (Gelder, 2010) (Slika 1.). Ova skupina holarktički je rasprostranjena te ju nalazimo u Sjevernoj i Srednjoj Americi, istočnoj Aziji i Europi (Gelder, 1999; Fard i Gelder, 2011).

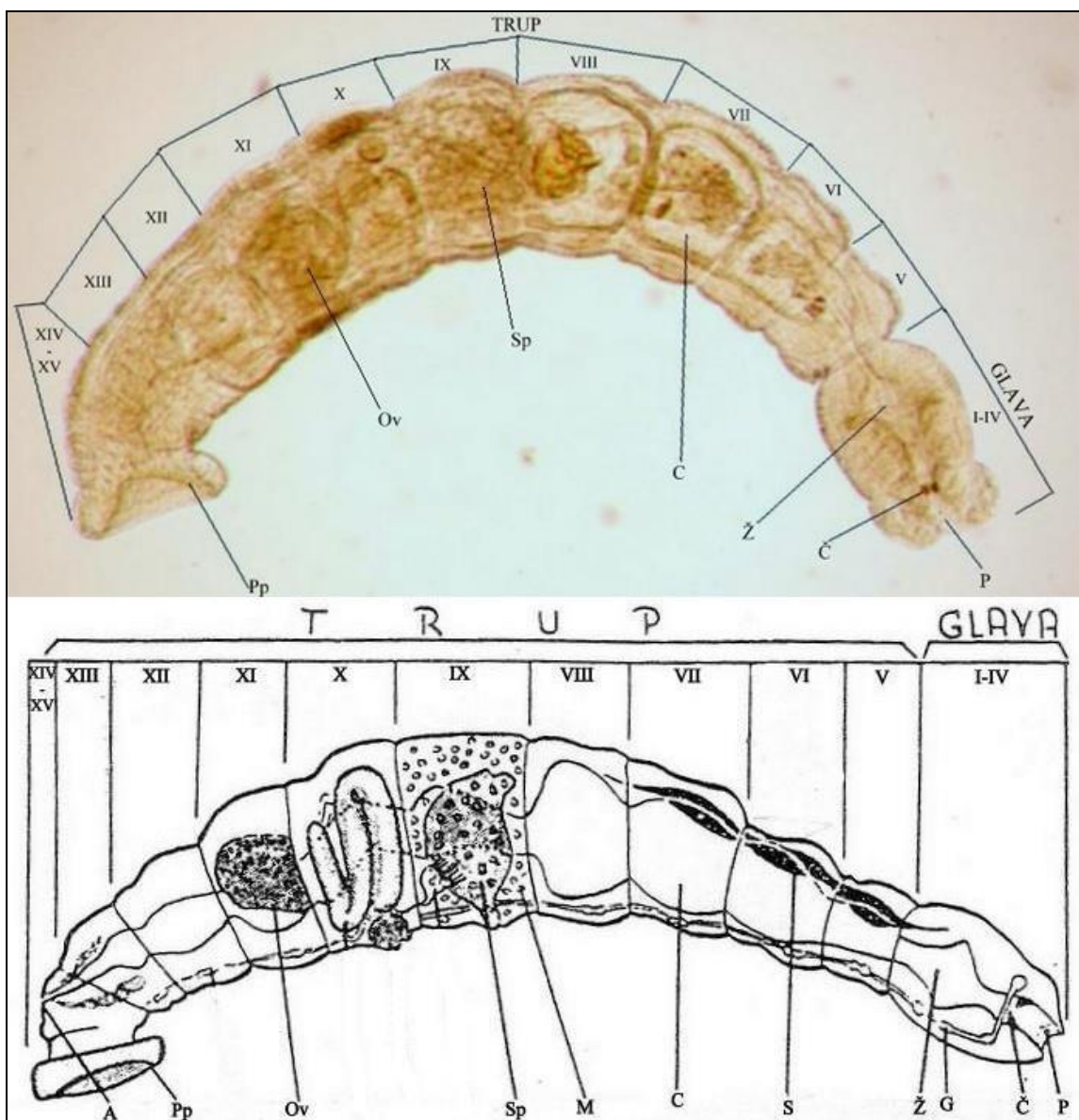


Slika 1. Branhiobdele kao epibionti na egzoskeletu raka.
Autor fotografije: Wayne Van Devender

Branhiobdele žive na vanjskoj površini tijela raka, no određene vrste obitavaju u škržnoj šupljini svojih domadara (Holt, 1977). Iako je zabilježeno kako branhiobdele određeno vrijeme mogu živjeti samostalno (Young, 1966; Evans i Edgerton, 2001), odrasle jedinke polažu oplođena jaja na egzoskelet rakova te im je on potreban za daljnji embrionalni razvoj (Gelder, 2010). Upravo iz tog razloga, ovaj simbiotski odnos je za branhiobdele obligatan. Također, branhiobdele se hrane detritusom i epibiontima (alge, praživotinje, ličinke kukaca i juvenilne branhiobdele) koji se nalaze na karapaksu njihovih domadara (Jennings i Gelder, 1979). Vrste koje žive u škržnoj šupljini rakova tradicionalno su smatrane parazitima koji se hrane tkivom i krvlju domadara (Holt, 1986; Matoničkin i sur., 1999). No, novija istraživanja ukazuju kako se branhiobdele prehranjuju epibiontima i česticama u škrgama rakova te tako sudjeluju u čišćenju istih (Brown i sur., 2002). Branhiobdele također imaju svoje parazite i epibionte, npr. trepetljikaše ili kolnjake (Gelder, 2010). Unatoč tome što su slatkovodni rakovi ekološki i

ekonomski bitna skupina, utjecaj ovih epibionata na njih još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

Branhiobdele su morfologijom prilagođene epibiontskom načinu života. Duljina tijela odrasle jedinke može biti od 1 do 12 mm te se uvijek sastoji od 15 kolutića (Karaman, 1967). Tijelo im je cilindričnog oblika te dorzoventralno spljošteno. Prva četiri kolutića su srasla te tvore glavu, dok ostalih 11 čine trup životinje (Slika 2.).



Slika 2. Prikaz morfologije branhiobdele pomoću fotografije i crteža. Označeni su glavni dijelovi tijela životinje – glava i trup. Kolutići tijela numerirani su rimskim brojevima. Organi su također označeni: P-peristomium, Č-hitinske čeljusti, G-ganglij, Ž-ždrijelo, S-pulsirajuća krvna žila u ulozi srca, C-crijevo, M-morule, Sp-spermateka, Ov-jajnik, Pp-posteriorna prijanjalka i A-analni otvor. Crtež preuzet i prilagođen iz Karaman (1967). Fotografirali: Klobučar i Maguire.

Na anteriornom i posteriornom dijelu tijela nalazi se po jedna prijanjalka. Pomoću njih branhiobdela se pokreće i pričvršćuje za domadara (Weigl, 1994). Između usne šupljine i ždrijela nalaze se dorzalna i ventralna hitinska čeljust. Veličina i oblik čeljusti najčešće variraju od vrste do vrste te su one ključne za morfološku determinaciju određenih vrsta (Karaman, 1967; Gelder, 1994). Branhiobdele su dvospolci, pri čemu je muški rasplodni sustav u petom kolutiću, dok je ženski u sedmom. Osim morfologije čeljusti, izgled muškog rasplodnog sustava također se koristi pri morfološkoj determinaciji pojedinih vrsta branhiobdela (Gelder, 2010).

1.2. SISTEMATIKA I EVOLUCIJA BRANHIOBDELA

Prve otkrivene branhiobdele opisane su kao predstavnici pijavica. Naime, konstantan broj kolutića, jaka posteriorna prijanjalka, analni otvor na dorzalnoj strani tijela, hitinske čeljusti, izostanak četina i prostomija su osobine zajedničke i pijavicama i branhiobdelama (Karaman, 1967). No, sve ove sličnosti su vjerojatnije posljedica konvergentne evolucije uslijed sličnog načina života. Prisutnost prijanjalki je posljedica epibiontskog načina života, analni otvor se premjestio na dorzalnu stranu tijela uslijed razvoja posteriorne prijanjalke, prostomij nedostaje zbog postojanja anteriorne prijanjalke. Nedostatak četina nije karakteristika samo pijavica i branhiobdela, već se to susreće i kod drugih kolutićavaca. Nadalje, pijavice imaju tri hitinske čeljusti, a branhiobdele imaju dvije. Također, spolni sustav kod pijavica i branhiobdela se bitno razlikuje (Karaman, 1967).

Branhiobdele su na temelju morfološke analize također tradicionalno smatrane i maločetinašima (Oligochaeta) (Pierantoni, 1912; Goodnight, 1940; Matoničkin i sur., 1999). Ovakvom sistematikom branhiobdele se tada dovelo u blisko srodstvo s gujavicama (Lumbriculida). Morfološke razlike između gujavica i branhiobdela su jasno uočljive: gujavice posjeduju četine i prostomij te nemaju stalan broj kolutića, prijanjalke niti hitinske čeljusti. Također, postoje velike razlike u građi mišićnog i spolnog sustava između branhiobdela i gujavica (Karaman, 1967).

Vodeći se navedenim morfološkim opažanjima, Holt (1965) proglašava branhiobdele zasebnim redom, Branchiobdellida, unutar razreda pojasnika (Clitellata). Morfološka odlika pojasnika jest postojanje pojasa ili kliteluma. Klitelum nastaje od

jednostaničnih žlijezda u epidermu te mu je funkcija izlučivanje sluzi koja se koristi za stvaranje kokona. Kod gujavica je klitelum vidljiv tijekom cijelog života, dok je kod ostalih pojasnika prisutan samo u vrijeme spolne aktivnosti (Matonićkin i sur., 1999).

Osim morfoloških značajki, molekularno-filogenetske analize, na temelju 18S rRNA i gena za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI), su potvrdile postojanje četiri reda unutar razreda Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellida, Hirudinida i Lumbriculida (Gelder i Siddall, 2001; Martin, 2001).

Prema najnovijoj sistematici, red Branchiobdellida sadržava jednu porodicu, Branchiobdellidae, koja se sastoji od četiri potporodice: Branchiobdellinae, Bdellodrilinae, Cambaricolinae i Xirondrilinae. Do sada je opisano 147 vrsta branhiobdela, podijeljenih u 22 roda (Gelder, 2010).

Molekularno-filogenetska istraživanja branhiobdela uglavnom su bila provođena kako bi se razriješili filogenetski odnosi unutar razreda Clitellata (Martin i sur., 2000; Martin, 2001; Erseus i Kallersjo, 2003). Istraživanja fokusirana na utvrđivanje molekularno-filogenetskih odnosa unutar reda Branchiobdellida su malobrojna. Najopsežnije takvo istraživanje provela je Williams i sur. (2013), pri čemu je utvrdila srodstvene odnose između američkih vrsta branhiobdela koristeći tri nuklearna (28S rRNA, 18S rRNA i ITS1) i dva mitohondrijska (COI i 16S rRNA) markera. Molekularno-filogenetska istraživanja roda *Branchiobdella* proveli su Füreder i sur. (2009) te Rosewarne i sur. (2012) te tako stvorili javno dostupne sekvence za mitohondrijski gen za COI, koje su korištene i u ovom istraživanju.

1.3. BRANHIOBDELE U HRVATSKOJ I EUROPI

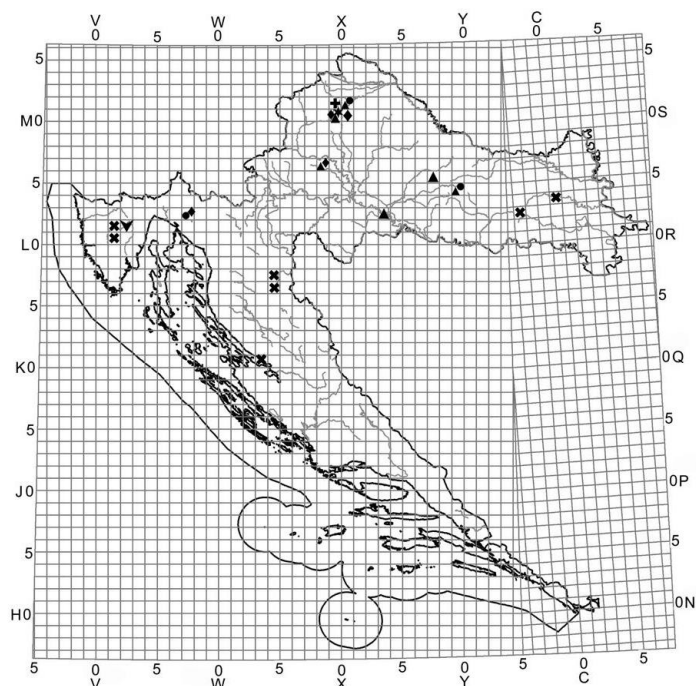
Autohtone branhiobdele u Europi pripadaju rodu *Branchiobdella* Odier, 1823, koji pak pripada potporodici Branchiobdelinae (Gelder, 1999). Ovaj rod je također rasprostranjen u istočnoj Aziji (Gelder i Ohatka, 2002), no pojedine vrste su endemične ili za to područje ili za područje Europe (Karaman, 1970).

Prema Gelder (1996) u Europi su prisutne sljedeće vrste iz roda *Branchiobdella*: *Branchiobdella astaci* Odier, 1823, *B. parasita* Henle, 1835, *B. pentodonta* Whitman, 1882, *B. hexodonta* Grüber, 1883, *B. italica* Canegallo, 1928, *B. balcanica* Moszyński, 1938 i *B. kozarovi* Subchev, 1978. Pri tome, Pop (1965) smatra kako su vrste *B.*

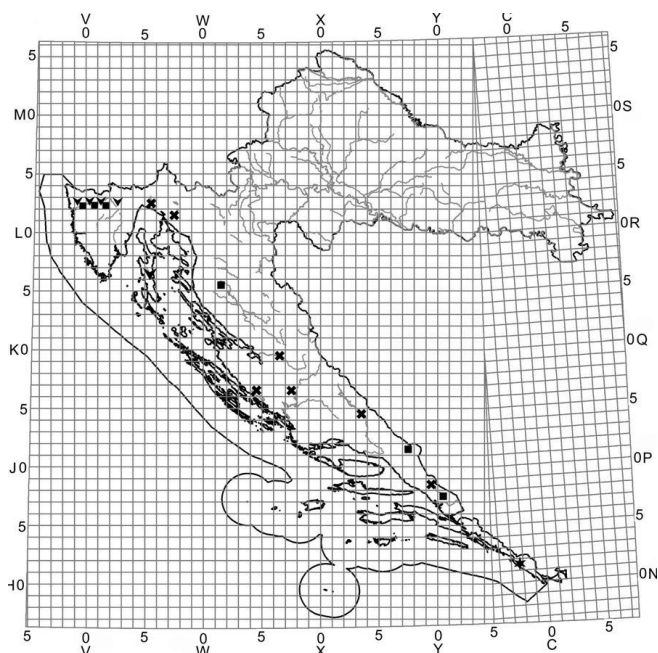
pentodonta, *B. italica* i *B. balcanica* zapravo podvrste koje tvore tkz. *pentodonta* kompleks (Karaman, 1970). Vrste *B. astaci* i *B. hexodonta* nastanjuju škržnu šupljinu rakova, dok ostale vrste žive na egzoskeletu domadara.

Raznolikost i distribuciju branhiobdela u Europi saželi su Pop (1965) i Karaman (1967, 1970). Detaljnija istraživanja provedena su u Bugarskoj (Subchev i Stanimirova, 1997), Sloveniji, Bosni i Hercegovini i Makedoniji (Karaman, 1967, 1970), Srbiji (Moszyński, 1938; Karaman, 1967), Alabaniji (Subchev, 2011), Grčkoj (Subchev i sur., 2007), Slovačkoj (Halgoš, 1972), sjevernoj Italiji (Gelder i sur., 1994; Gelder i sur., 1999; Oberkofler i sur., 2002), Austriji (Nesemann, 1994) i Njemačkoj (Vogt, 1999).

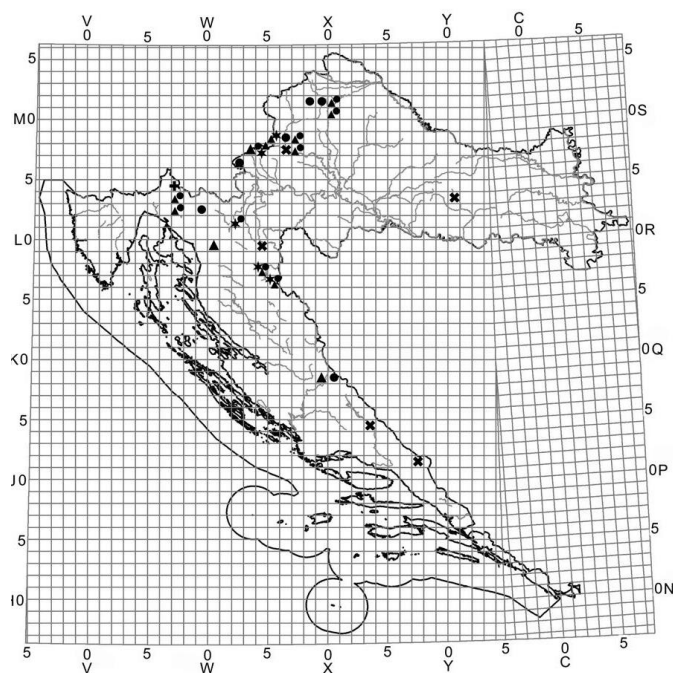
Prva istraživanja branhiobdela u Hrvatskoj proveli su Karaman (1967, 1970), koji je zabilježio vrstu *B. italica* u području jadranskog sliva, te Georgevitch (1957), koji je proučavao branhiobdele rijeke Cetine. Najopsežnije istraživanje raznolikosti i distribucije roda *Branchiobdella* u Hrvatskoj proveli su Klobučar i sur. (2006). Prilikom istraživanja autori su pregledali 80 populacija hrvatskih autohtonih rakova vrsta *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), *Astacus leptodactylus* Eschscholz, 1823, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) i *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803) te tri populacije alohtonog raka *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). Rasprostranjenost rakova iz porodice Astacidae u Hrvatskoj sažele su Maguire i Gottstein-Matočec (2004). Vrsta *A. pallipes* rasprostranjena je u jadranskoj regiji, od Istre do Crne Gore. Vrstu *A. torrentium* nalazimo u unutrašnjem dijelu Hrvatske. Vrstu *A. astacus* također nalazimo u unutrašnjem dijelu, ali ova je vrsta rasprostranjena na nižim nadmorskim visinama od vrste *A. torrentium*. Obje vrste također nalazimo i u jadranskoj regiji, ali pretpostavlja se kako su tamo introducirane od strane čovjeka (Maguire i sur., 2006). Vrstu *A. leptodactylus* nalazimo također u unutrašnjosti Hrvatske. Branhiobdele su pronađene na vrstama *A. astacus*, *A. pallipes* i *A. torrentium*. Tim istraživanjem u Hrvatskoj je utvrđena prisutnost šest vrsta branhiobdela: *B. astaci*, *B. balcanica*, *B. hexodonta*, *B. italica*, *B. parasita* i *B. pentodonta* (Slika 3., Slika 4., Slika 5.).



Slika 3. Rasprostranjenost vrsta branhiobdela koje žive kao epibionti na vrsti *A. astacus* (▲ = *B. parasita*, ● = *B. pentodonta*, Δ = *B. astaci*, ◆ = *B. balcanica*, ○ = *B. hexodonta*, * = nije identificirano, x = nije pronađeno). Preuzeto iz Klobučar i sur. (2006).



Slika 4. Rasprostranjenost vrsta branhiobdela koje žive kao epibionti na vrsti *A. pallipes* (■ = *B. italica*, Δ = *B. astaci*, ○ = *B. hexodonta*, * = nije identificirano, x = nije pronađeno). Preuzeto iz Klobučar i sur. (2006).



Slika 5. Rasprostranjenost vrsta branhiobdela koje žive kao epibionti na vrsti *A. torrentium* (▲ = *B. parasita*, ● = *B. pentodonta*, ○ = *B. hexodonta*, * = nije identificirano, x = nije pronađeno). Preuzeto iz Klobučar i sur. (2006).

Komercijalni uvoz alohtonih vrsta rakova, poglavito onih sjevernoameričkih, u Europu započeo je prije 150 godina, ali vrhunac je doživio 1960. godine (Holdich i sur., 1999; Lewis, 2002). U Europu su introducirani i njihovi epibionti, alohtone vrste branhiobdela (Gelder i sur., 1999; Quaglio i sur., 2002; Gelder, 2004; Gelder i sur., 2012). Na introduciranim rakovima vrsta *Procambarus clarkii* (Girard, 1825) i *O. limosus* zabilježene su europske autohtone vrste branhiobdela (Gelder i sur., 1999; Vogt, 1999).

Dosadašnja istraživanja roda *Branchiobdella* u Europi i Hrvatskoj su uglavnom bila usmjerena na utvrđivanje raznolikosti unutar roda te na distribuciju pojedinih vrsta. Molekularno-filogenetska istraživanja europskih vrsta branhiobdela su malobrojna (Füreder i sur., 2009; Rosewarne i sur., 2012), ali značajna za ovu još nedovoljno istraženu skupinu životinja.

1.4. FILOGENIJA

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi istraživanjem evolucijske prošlosti različitih taksonomskih kategorija, proučavajući srodstvene odnose između i unutar pojedinih taksona. Termin „filogenija” uveo je 1866. godine Ernest Haeckel (Harper, 2010). Srodstveni odnosi unutar i između pojedinih taksona mogu se utvrditi proučavanjem njihove morfologije, anatomije, biogeografije, embriologije, paleontologije i fiziologije.

Osnova za proučavanje filogenije jesu homologije, tj. sličnosti između taksona koje su posljedica nasljeđivanja od zajedničkog pretka. Pleziomorfija predstavlja ancestralno karakterno stanje koje je prisutno kod zajedničkog pretka taksona koji se istražuje. Simpleziomorfija je ancestralno karakterno stanje koje dijele dva ili više taksona potomaka. Apomorfija je izvedeno karakterno stanje koje nije prisutno kod zajedničkog pretka taksona koji se istražuje. Pri tome je autapomorfija izvedeno karakterno stanje specifično za jedan takson, dok je sinapomorfija izvedeno karakterno stanje prisutno kod dva ili više taksona. Ponekad sličnosti između pojedinih taksona ne moraju biti posljedica postojanja zajedničkog pretka, već posljedica konvergentne evolucije (Kalafatić, 1998). Takve sličnosti nazivamo homoplazijama. Homoplazije se najčešće javljaju kod taksona koji žive u podneblju gdje vladaju slični selektivni pritisci

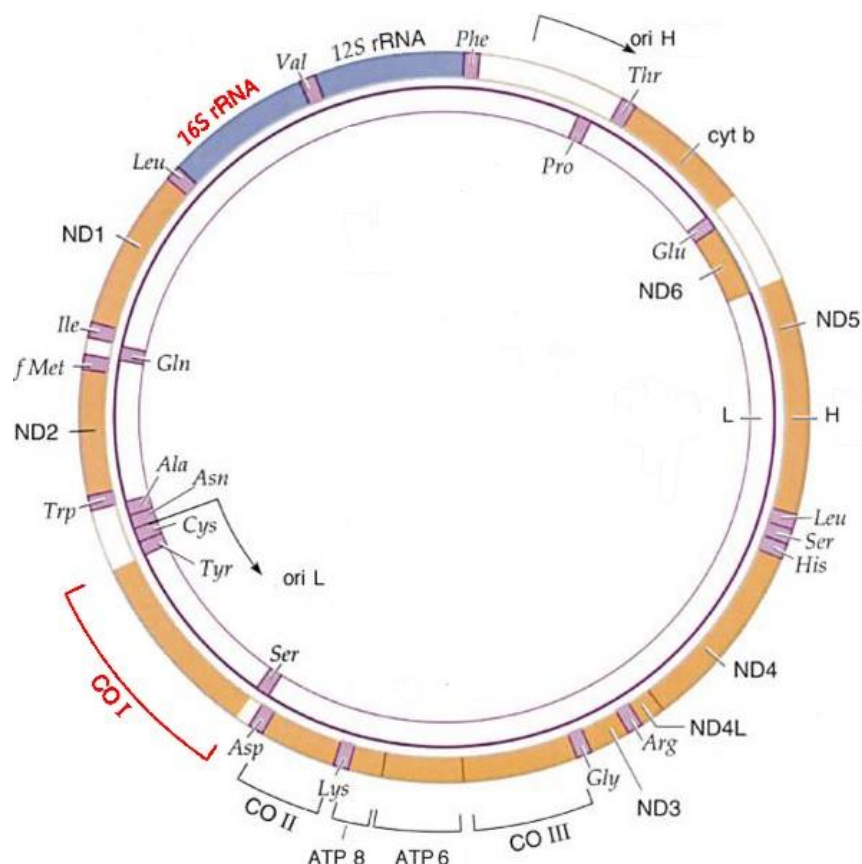
te onda taksoni neovisno razvijaju slična svojstva. Vrlo je važno razlikovati homologije od homoplazija jer one mogu dovesti do krive filogenetske interpretacije.

1.5. MOLEKULARNA FILOGENIJA

Srodstveni odnosi između pojedinih taksona se mogu proučavati i na razini makromolekula, DNA i proteina, čime se bavi zasebna grada filogenije - molekularna filogenija. Svaka molekularno-filogenetska analiza sastoji se od odabira taksona kojeg želimo proučavati, postavljanja problema, prikupljanja uzoraka, odabira prikladnog genskog markera, izolacije DNA iz organizma, umnažanja odabranog molekularnog markera lančanom reakcijom polimeraze (PCR), elektroforetskim provjeravanjem dobivenih produkata, pročišćavanjem produkata i sekvenciranjem. Dobivene sekvence zatim se sravnjuju i obrađuju korištenjem različitih softverskih programa.

Odabir prikladnog genskog markera ključan je za filogenetsku analizu. Genski markeri su najčešće dijelovi molekule DNA koji su varijabilni te se lako identificiraju i izoliraju (Schulman i sur., 2004). U DNA sekvencama tokom vremena događa se supstitucija nukleotida. Takve promjene koriste se za rekonstrukciju evolucijske povijesti organizma. Na temelju nukleotidnih supstitucija također se može odrediti vrijeme divergencije pojedinih taksona jer se promjene, prema teoriji molekularnog sata, nakupljaju linearno u vremenu (Zuckerkandl i Pauling, 1965). Izrazito varijabilni genski markeri prikladni su za istraživanja na nižim taksonomski razinama, dok se oni visoko konzervirani koriste za istraživanja na višim taksonomskim razinama.

U zoologiji se mogu koristiti genski markeri ili iz jezgrine ili iz mitohondrijske DNA (mtDNA). Zbog velikog broja kopija, lake izolacije, nepostojanja rekombinacije te brže evolucije od jezgrine DNA, mtDNA se često koristi u molekularno-filogenetskim istraživanjima. MtDNA je kružna dvolančana molekula, veličine od 15,7 do 19,5 kb. Mitohondrijski genom gotovo svih životinja sadrži 37 gena: dva za rRNA, 13 za proteine i 22 za tRNA (Tzgaloff i Myers, 1986) (Slika 6.).



Slika 6. Shematski prikaz mtDNA. Crvenom bojom označeni su geni za COI i 16S rRNA, koji su korišteni kao genski markeri u ovom istraživanju. Preuzeto i prilagođeno sa www.mayo.edu.

1.6. FILOGENETSKO STABLO

Završni produkt svake filogenetske analize je filogenetsko stablo, koje prikazuje evolucijske odnose između određenih taksona. Svako filogenetsko stablo sastoji se od čvorova i grana. Čvorovi predstavljaju taksonomske jedinice koje proučavamo. Oni mogu biti unutarnji ili vanjski. Vanjski čvorovi predstavljaju taksona koje proučavamo u istraživanju, a unutarnji označavaju njihove hipotetske zajedničke pretke. Grane na filogenetskom stablu predstavljaju njegovu topologiju. Postoje dvije vrste grana - unutarnje i vanjske. Vanjske grane završavaju taksonima koje proučavamo, dok unutarnje povezuju te taksona i njihovog hipotetskog pretka (Hall, 2007).

Filogenetsko stablo također može biti ukorijenjeno ili neukorijenjeno. Ukorijenjeno stablo je ono kod kojeg sve grane potječu iz jedinstvenog čvora. Stablo se ukorijenjuje pomoću vanjske skupine. Vanjska skupina nije član taksona kojeg proučavamo, već je to taksonomska jedinica koja je blisko srodna s njim. Neukorijenjena

stabla predstavljaju srodstvene odnose između određenih taksona bez stvaranja hipoteza o zajedničkim precima (Hall, 2007).

Prilikom analize dobivenog filogenetskog stabla određeni taksoni mogu biti monofiletskog, polifiletskog ili parafiletskog podrijetla. Monofiletska grupa organizama je ona kod koje su svi potomci podrijetlom od istog zajedničkog pretka, koji je karakterističan za tu grupu organizama. Suprotno tome, grupa organizama koja sadrži taksone koji nisu blisko srodni i imaju više zajedničkih predaka jest polifiletska grupa organizama. Parafiletska grupa je ona koja sadrži najmlađeg zajedničkog pretka, ali ne sadrži sve potomke tog pretka (Li, 1997).

U molekularno-filogenetskim analizama ne postoji jedinstvena metoda za rekonstruiranje filogenetskog stabla. Stoga se koristi više pristupa kako bi se povećala vjerodostojnost dobivenih rezultata. Metode bazirane na matrici udaljenosti (*distance matrix*) za rekonstrukciju stabala koriste analize klastera i minimalne evolucije. „Klasteriranjem” se traži najmanja međusobna razlika između dva člana u matrici udaljenosti. Najpoznatija takva metoda je metoda susjednog sparivanja (*neighbor joining*). Postoje i metode bazirane na stanjima karaktera (*character state*). Te metode rekonstruiraju filogenetska stabla proučavajući nukleotide i aminokiseline na pojedinoj poziciji u sravnjenju, kao i pojavu insercija i delecija (Li, 1997). Najčešće se koriste metode najveće vjerojatnosti (ML) (Felsenstein, 1973, 1981), najveće štedljivosti (MP) (Swofford, 2001) i Bayesian analiza (BA) (Mau i sur., 1999).

2. CILJEVI

- Morfološka determinacija vrsta roda *Branchiobdella* izoliranih s rakova roda *Austropotamobius* prikupljenih s različitih lokaliteta od 2005. – 2012. godine
- Doprinos poznavanju rasprostranjenosti pojedinih vrsta roda *Branchiobdella* u Hrvatskoj
- Utvrđivanje molekularno-filogenetskih odnosa između vrsta roda *Branchiobdella* i odabranih vanjskih grupa analizom nukleotidnih sekvenci gena za COI i 16S rRNA
- Utvrđivanje genetske udaljenosti unutar i između vrsta roda *Branchiobdella*
- Usporedba dobivenog molekularno-filogenetskog stabla s rezultatima filogenetskih analiza rakova iz roda *Austropotamobius* (Klobučar i sur., 2013), kako bi se utvrdila moguća koevolucija

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORKOVANJE BRANHIOBDELA

Prilikom uzorkovanja slatkovodnih rakova roda *Austropotamobius* od kolovoza 2005. do prosinca 2012. godine, također se posredno vršilo sakupljanje uzoraka branhiobdela koje su živjele kao epibionti na rakovima (Maguire i sur., 2011). Sakupljeni rakovi su konzervirani u 95 % alkoholu, u odgovarajućim spremnicima.

3.2. IZOLACIJA I MORFOLOŠKA DETERMINACIJA BRANHIOBDELA

Uzorci rakova vrsta *A. pallipes* i *A. torrentium* sa 74 lokaliteta pregledani su kako bi se utvrdilo jesu li prisutne branhiobdele (Tablica 1.).

Tablica 1. Popis populacija rakova koje su pregledane kako bi se utvrdila prisutnost branhiobdela. Haplotip rakova preuzet je iz rada Klobučar i sur. (2013), pri tome je BAN- Banovina, CSE- jugoistočna Europa, GK- Gorski kotar, LD- Lika i Dalmacija, SB- južni Balkan, ZV- Zeleni Vir, ŽPB- Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (za vrstu *A. torrentium*), CARS- carsicus, MER- meridionalis (za vrstu *A. pallipes*). Legatori su Maguire i sur. (2011).

Vrsta raka (broj rakova)	Haplotip raka	Lokalitet	Datum sakupljanja
<i>A. torrentium</i> (1)	BAN	potok Maja, Kamešnica, Banovina	17.7.2009.
<i>A. torrentium</i> (2)	BAN	Bručina, Mali Gradac	21.7.2010.
<i>A. torrentium</i> (1)	BAN	Slatina	21.7.2010.
<i>A. torrentium</i> (6)	CSE	Sliv Bosne, Zavidovići, BiH	siječanj 2010.
<i>A. torrentium</i> (5)	CSE	potok Vučjak, Jagodnjak	6.6.2008.
<i>A. torrentium</i> (1)	CSE	potok Bukovica, Požega	6.6.2008.
<i>A. torrentium</i> (15)	CSE	Bugarska, dunavski sliv	ljetu 2006.
<i>A. torrentium</i> (3)	CSE	potok Kavuš, Bistrica selo	ljetu 2009.
<i>A. torrentium</i> (9)	GK	Blate	21.8.2008.
<i>A. torrentium</i> (11)	GK	Blate	19.7.2007.
<i>A. torrentium</i> (8)	GK	Dobra, Bukovska Gramaljska	8.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (1)	GK	Bresni potok	10.4.2011.
<i>A. torrentium</i> (12)	GK	Skrad	8.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (4)	GK	Curak, HE Zeleni vir	8.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (5)	GK	Vele Vode	8.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (7)	GK	Leskova draga	9.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (2)	LD	Orašnica, Guge, Knin	16.8.2010.
<i>A. torrentium</i> (2)	LD	Srebrenica, Sklop selo	17.8.2010.
<i>A. torrentium</i> (11)	LD	Kobilica	5.5.2010.
<i>A. torrentium</i> (2)	LD	Krasulja	12.6.2010.
<i>A. torrentium</i> (4)	LD	Zrmanja	9.5.2005.
<i>A. torrentium</i> (1)	SB	Rashane, Kosovo	9.9.2009.
<i>A. torrentium</i> (24)	SB	Rijeka Crnojevića, Crna Gora	ljetu 2009.
<i>A. torrentium</i> (2)	SB	Bitola	1.8.2005.
<i>A. torrentium</i> (3)	SB	Bošava	17.7.2005.
<i>A. torrentium</i> (3)	SB	Jakupica, Makedonija	30.7.2005.
<i>A. torrentium</i> (8)	ZV	Zeleni Vir	21.8.2008.
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	Sušik, polje Lug	9.9.2008.

<i>A. torrentium</i> (4)	ŽPB	polje Lug	29.8.2007.
<i>A. torrentium</i> (9)	ŽPB	Krakar, Krakarsko polje	10.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (5)	ŽPB	Krakarski potok	8.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	Bojna, Banovina	17.7.2009.
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	potok Ratković	17.7.2009.
<i>A. torrentium</i> (6)	ŽPB	bezimeni potok, pritoka Dretulje, Ralići	9.9.2008.
<i>A. torrentium</i> (3)	ŽPB	Drežnica	rujan 2008.
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	potok Krnjak, Brebornica	3.5.2008.
<i>A. torrentium</i> (3)	ŽPB	potok Gradusa, Žabari	17.7.2009.
<i>A. pallipes</i> (5)	CARS	Rječina, Martinovo selo	1.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (30)	CARS	Argila	ljeto 2011.
<i>A. pallipes</i> (1)	CARS	Rječina, Kukuljani	26.10.2004.
<i>A. pallipes</i> (6)	MER	Bračana	2.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (30)	MER	Bračana	ljeto 2011.
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Račica, Rimnjak	2.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Mirna, Rušnjak	2.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Mirna, Kotli	2.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Butoniga, Kršlika	29.6.2007.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Butoniga	28.6.2007.
<i>A. pallipes</i> (26)	MER	Pivka	ljeto 2011.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Grdoselski potok	15.7.2010.
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Raša	ljeto 2010.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	pritoka Butonige, Barušići	27.3.2011.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Butoniga	27.8.2010.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Mirna, Motovunska šuma	16.9.2009.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Mirna, ispod Motovuna	12. i 13.8.2004.
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Otuča, Gračac	12.9.2008.
<i>A. pallipes</i> (6)	MER	Krušnica, blizu Mudrog vrila	12.9.2008.
<i>A. pallipes</i> (5)	MER	potok kod Mudrog vrila, između Krušnice i Obsenice	12.9.2008.
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Rakovac, Lika	11.6.2010.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Zrmanja	ljeto 2010.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	izvor Krupe	7.5.2010.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Vransko jezero, lateralni kanal	18.4.2010.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Sutina, Lučane	15.8.2010.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Sutina	14.7.2009.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	izvor Rude, Grab	31.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Drniš	7.6.2007.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Vrba, Bračević	22.11.2012.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Vrba, pritoka Čikole	10.7.2008.
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	potok Kotluša	kolovoz 2012.
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Prološko jezero	31.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	kanjon Badnjevice	31.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Žutić, Dobrić, Mostarsko blato, BiH	19.5.2012.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	izvor Žukovica, Posušje, BiH	30.5.2008.
<i>A. pallipes</i> (5)	MER	Vrioštica, BiH	30.5.2008.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	izvor Jasle, PP Blidinje, BiH	4.10.2008.
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Nezdravica Tihaljina, BiH	19.5.2012.
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Mislina, Bijeli vir	28.9.2009.
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	pritoka Kopačice, Konavle	30.5.2009.
<i>A. pallipes</i> (36)	MER	rijeka Zeta, Danilovgrad, Crna Gora	svibanj 2009.

Pod stereomikroskopom proizvođača Olympus, marke SZX9, pregledan je alkohol u kojem su rakovi konzervirani. Također, pregledane su škrge jedinki vrsta *A. torrentium* i *A. pallipes*. Ukoliko su branhiobdele bile prisutne, konzervirane su u svježem 95 % alkoholu u nepropusnim bočicama.

Dio izoliranih branhiobdela sa svakog lokaliteta je morfološki determiniran prema ključu Gelder (1994). Jedinkama je pod stereomikroskopom pomoću skalpela odvojena glava, koja je zatim pincetom prenesena u destiliranu vodu kako bi se uklonio alkohol. Nakon toga glava je uklopljena, na predmetnom stakalcu, u Hoyerovoj otopini kako bi se lakše vizualizirale čeljusti životinje. Hoyerova otopina je prethodno pripravljena miješanjem 200 g kloralhidrata ($\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$), 20 g glicerina ($\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$) i 30 g gumi arabike u 50 g destilirane vode. Jedinke su zatim determinirane pod mikroskopom (Olympus CX21) na temelju morfologije čeljusti. Ostatak tijela svake determinirane jedinke je pojednično konzerviran u 95 % alkoholu te obilježen odgovarajućom šifrom. Na taj je način pripremljeno tkivo za izolaciju DNA.

3.3. IZOLACIJA DNA

Ukupna genomska DNA izolirana je iz pojedinih jedinki korištenjem kita GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države), prema preporukama proizvođača. DNA je eluirana u 50 μL pufera (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0). Koncentracija i kvaliteta izolirane DNA provjeravana je nanofotometrom NanoPhotometer®P-Class (Implen, München, Njemačka).

3.4. UMNAŽANJE, PROČIŠĆAVANJE I SEKVENCIRANJE DNA

Za umnažanje putem metode lančane reakcije polimerazom (PCR), odabrani su mitohondrijski geni za COI i 16S rRNA jer su već korišteni kao genski markeri u molekularno-filogenetskim analizama branhiobdela (Füreder i sur., 2009; Rosewarne i sur., 2012; Williams i sur., 2013) i rakova roda *Austropotamobius* (Klobučar i sur., 2013). Za izvođenje PCR reakcije koristio se uređaj Mastercycler® personal (Eppendorf, Njemačka).

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 μ L sadržavala je 1 X *Taq* pufer s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 μ M svakog dNTP-a, 0,25 μ M obje početnice, optimiziranu koncentraciju MgCl_2 (2,5 mM za COI, 3 mM za 16S rRNA), 1 U *Taq* DNA polimeraze te 20-100 ng DNA kalupa. Reakcijska smjesa nadopunjena je destiliranom vodom (Qiagen, Hilden, Njemačka), kako bi ukupni volumen iznosio 20 μ L. Prilikom svake PCR reakcije korištena je i negativna kontrola, koja je služila kako bi se provjerila čistoća pojedinih reagensa te pribora. U reakcijsku smjesu negativne kontrole nije dodan DNA kalup. Početnice korištene za ovo istraživanje preuzete su iz literature (Tablica 2.).

Tablica 2. Početnice korištene u PCR reakcijama za COI i 16S rRNA.

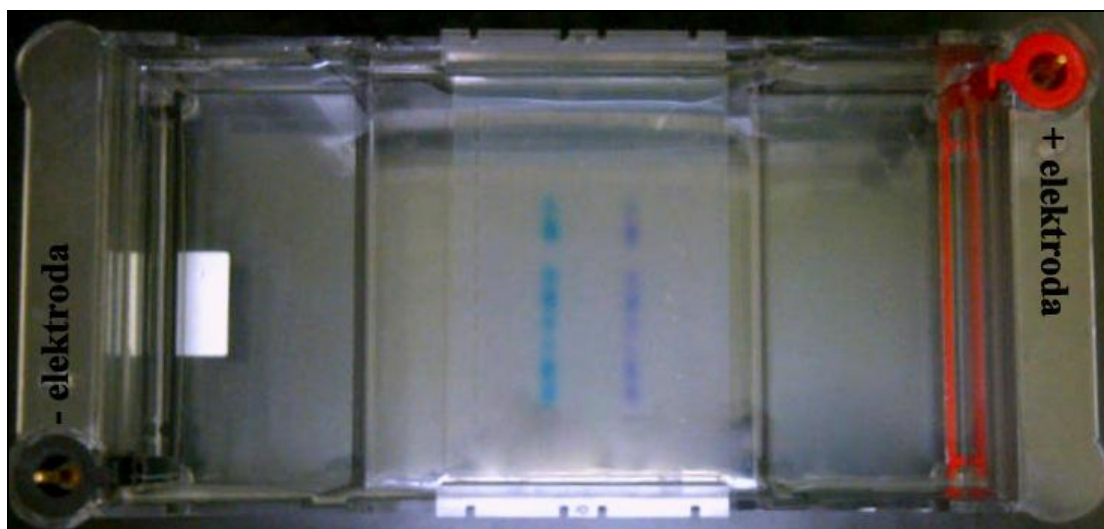
Gen	Naziv početnice	Sekvenca početnice 5'-3'	Literatura
COI	LCO-1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer i sur., (1994)
	HCO-2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer i sur., (1994)
16S rRNA	ArL	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi i sur., (1991)
	BrH	CCGGTCTGACTCAGATCACGT	Palumbi i sur., (1991)

Prvi korak u reakciji PCR je denaturacija pri temperaturi 95 °C, u trajanju 3 minute. Nakon toga započinje 35 ciklusa tijekom kojih se odvija denaturacija, sparivanje početnica te produljivanje lanca DNA. Duljina trajanja ovih koraka prilagođena je pojedinom genu (Tablica 3.). Završno produljivanje lanca DNA odvijalo se pri temperaturi 72 °C, u trajanju 5 minuta. Posljednji korak je hlađenje uzoraka na temperaturu 4 °C, kako se dobiveni produkti ne bi razgradili.

Tablica 3. PCR uvjeti za gene za COI i 16s rRNA.

Korak reakcije	COI (temperatura / trajanje)	16S rRNA (temperatura / trajanje)
Inicijalna denaturacija	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
Denaturacija	94 °C / 30 s	95 °C / 1 min
Sparivanje početnica	48 °C / 30 s	56 °C / 1 min
Produljivanje lanca DNA	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min
Završno produljivanje lanca DNA	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
Hlađenje	4 °C / ∞	4 °C / ∞

Uspješnost reakcije PCR i veličina dobivenih fragmenata DNA provjeravani su elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 1,2 g agaroze u 80 ml 1 X TAE pufera. Na gel se nanosilo 5 μ L pojedinog uzorka. Zbog lakšeg praćenja elektroforeze, uzorak je na parafilmu pomiješan s 1 μ L boje Gel Pilot Loading Dye 5 X (Qiagen, Hilden, Njemačka). Elektroforeza se provodila u 1 X TAE puferu pri 150V, u trajanju 45 minuta (Slika 7.). Za određivanje veličine dobivenog fragmenta DNA koristila sam standard Gene Ruler 1 KB (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD).



Slika 7. Kadica za elektroforezu na kojoj su označene negativna i pozitivna elektroda. U kadici se nalazi 1,5 % agarozni gel na kojeg su nanoseni produkti PCR reakcije. Zbog lakšeg praćenja tijekom elektroforeze produkti su pomiješani s dvokomponentnom bojom Gel Pilot Loading Dye 5 X (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Kako bi DNA bila vidljiva pod UV svjetlom, gel se bojaio 20 minuta u razrijeđenoj otopini etidij bromida (0,5 mg/ml). Gel je zatim stavljen na transiluminator te fotografiran digitalnim fotoaparatom.

PCR produkti su zatim poslani na pročišćavanje i sekvenciranje u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Sekvenciranje se odvijalo upotrebom LCO i ArL početnica, čije su karakteristike navedene u Tablici 2.

3.5. RAČUNALNE ANALIZE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

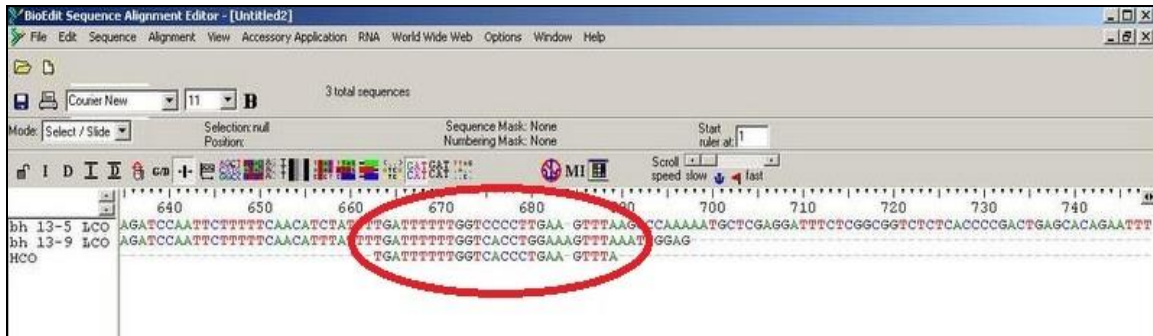
3.5.1. NUKLEOTIDNE SEKVENCE KORIŠTENE U MOLEKULARNO-FILOGENETSKOJ ANALIZI

Nakon završenog sekvenciranja, s korisničke stranice Macrogen Inc. preuzete su sekvence. Sve eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence prvo su provjerene pripadaju li branhiobdelama. Ova provjera provela se korištenjem programa za lokalno sravnjnje BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) (Altschul i sur., 1999), koji uspoređuje eksperimentalno dobivenu nukleotidnu sekvencu s onim već postojećima u bazi NCBI.

Osim eksperimentalno dobivenih sekvenci, u molekularno-filogenetskoj analizi korištene su i sekvence europskih vrsta branhiobdela i vanjskih grupa, koje su dostupne u bazi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Za vanjske grupe odabrane su vrsta *Hirudo medicinalis* te dvije vrste američkih branhiobdela - *Magmatodrilus obscurus* i *Triannulata magna*.

3.5.2. SRAVNJIVANJE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

Sve računalne analize nukleotidnih sekvenci provedene su zasebno za gen za COI i zasebno za gen za 16S rRNA. Eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence međusobno su sravnjene u programu Bioedit 7.2.4. (Hall, 1999) pomoću ClustalW višestrukog sravnjivanja (Larkin i sur., 2007). Prije daljnjih analiza svim je sekvencama odrezan početak koji je lošije kvalitete te početnica (Slika 8.).



Slika 8. Mjesto stvarnjivanja sekvenci i početnice. Prije daljnjih molekularno-filogenetskih analiza, početnicu je potrebno odrezati iz sekvence.

Nakon toga, sekvence dobivene eksperimentalnim radom su stvarnjene sa sekvencama preuzetim iz baze Genbank, također pomoću ClustalW višestrukog stvarnjivanja. Svaka razlika u sekvencama provjerena je pregledavanjem kromatograma pojedine sekvence. Sve greške su ručno ispravljene, npr. ako je signal pogrešno očitana, ako se signali od dvaju baza preklapaju ili ako je neka baza izostavljena (Slika 9.).



Slika 9. Crvena strelica označava mjesto gdje se preklapaju signali dvaju baza. Očitana je baza T, ali vidljiv je i signal baze C. U ovom slučaju se baza T ručno zamjenjuje znakom „Y“, koji znači ili baza T ili baza C.

Nakon pregleda svih sekvenci, u onim eksperimentalno dobivenim uočene su točkaste mutacije u pojedinim sekvencama. Višestruko stvarnjene sekvence za svaki gen posebno su pohranjene u formatima fasta i nexus. Nukleotidni slijed sekvenci gena COI pretvoren je u aminokiselinski slijed u programu Mega 6 (Tamura i sur., 2013), radi provjere stop kodona. Naime, budući da je gen COI protein kodirajući, prisutnost stop kodona u sekvenci ukazivala bi na umnažanje pseudogena.

3.5.3. FILOGENETSKE ANALIZE SRAVNJENIH SEKVENCI

Za prikaz evolucijskih odnosa između i unutar vrsta roda *Branchiobdella* i vanjskih skupina, odabrane su četiri metode: analiza najveće vjerojatnosti (ML), najveće štedljivosti (MP), susjednog sparivanja (NJ) te Bayesianovog zaključivanja (BA). Nazivi programa korišteni za pojedinu analizu nalaze se u Tablici 4.

Tablica 4. Programi korišteni za analize sravnjenih sekvenci i rekonstrukciju filogenetskih stabala.

Naziv programa	Provedena analiza	Literaturni navod
jModelTest 2.1.5.	analiza najboljeg evolucijskog modela	Darriba i sur., 2012
Mega 6	metoda najveće vjerojatnosti (ML) metoda najveće štedljivosti (MP) metoda susjednog sparivanja (NJ)	Tamura i sur., 2013
Mr. Bayes	Bayesian zaključivanje (BA)	Huelsenbeck i Ronquist, 2003

Prije provođenja analiza, bilo je potrebno odrediti evolucijski model za svaki gen. Evolucijski modeli opisuju na koji način je došlo do nukleotidnih promjena (mutacija, insercija, delecija, itd.) u sekvencama koje koristimo prilikom izrade filogenetskih stabala (Hall, 2007). Evolucijski modeli za BA i ML analizirani su računalnim programom jModelTest 2.1.5. (Darriba i sur., 2012), korištenjem Bayesian informacijskog kriterija (BIC). Za analize gena COI, predložen je kao najbolji evolucijski model HKY (Hasegawa i sur., 1985) uz predloženu gama distribuciju (HKY+G). Optimalan evolucijski model prema BIC-u za 16S rRNA bio je TIM2 (Transition model 2) uz predloženu gama distribuciju (TIM2+G), koji je korišten u BA analizi. Budući da u programu Mega 6 ne postoji taj model, za ML analizu koristio se GTR model (General Time Reversible model) uz predloženu gama distribuciju (GTR+G), prvi sljedeći kojeg je BIC procijenio dobrim.

U analizama provedenim ML, MP i NJ metodama, kao podrška koristila se metoda *bootstrap*. Pri tome je za ML i MP analize korištena vrijednost 100 *bootstrap* ponavljanja, dok je za analizu NJ korištena vrijednost 1000 *bootstrap* ponavljanja. U BA analizi kao podrška koristila se metoda *posterior probability*.

Dobivena filogenetska stabla uređivana su računalnim programima FigTree 1.4.0. (Rambaut, 2012) i CorelDrawX5.

3.5.4. GENETSKE UDALJENOSTI NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

U programu Mega 6 proveden je izračun udvojenih distanci (*pairwise distance* – p-distanca) koji prikazuje genetske udaljenosti unutar i između pojedinih vrsta roda *Branchiobdella*. Genetska udaljenost izračunata je zasebno za gen COI i za gen 16S rRNA.

4. REZULTATI

4.1. IZOLIRANE I MORFOLOŠKI DETERMINIRANE BRANHIOBDELE

Prilikom pregledavanja uzoraka rakova roda *Austropotamobius* sa 74 lokaliteta, branhiobdele su pronađene na njih 59. Morfološkom determinacijom utvrđene su samo autohtone vrste branhiobdela: *B. astaci*, *B. hexodonta*, *B. parasita* i *B. pentodonta* kompleks (Tablica 5.).

Tablica 5. Vrste te ukupni broj branhiobdela pronađen na pojedinim lokalitetima. Pri tome je N.P.- nije pronađeno i N.I.- nije identificirano. Haplotip rakova preuzet je iz rada Klobučar i sur. (2013), pri tome je BAN- Banovina, CSE- jugoistočna Europa, GK- Gorski kotar, LD- Lika i Dalmacija, SB- južni Balkan, ZV- Zeleni Vir, ŽPB- Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (za vrstu *A. torrentium*), CARS- carsicus, MER- meridionalis (za vrstu *A. pallipes*). Legatori su Maguire i sur. (2011).

Vrsta raka (broj rakova)	Haplotip raka	Lokalitet	Vrsta branhiobdele	Broj branhiobdela
<i>A. torrentium</i> (1)	BAN	potok Maja, Kamešnica, Banovina	<i>B. hexodonta</i>	5
<i>A. torrentium</i> (2)	BAN	Bručina, Mali Gradac	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	9
<i>A. torrentium</i> (1)	BAN	Slatina	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	15
<i>A. torrentium</i> (6)	CSE	Sliv Bosne, Zavidovići, BiH	N.P.	-
<i>A. torrentium</i> (5)	CSE	potok Vučjak, Jagodnjak	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	18
<i>A. torrentium</i> (1)	CSE	potok Bukovica, Požega	N.P.	-
<i>A. torrentium</i> (15)	CSE	Bugarska, dunavski sliv	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	242
<i>A. torrentium</i> (3)	CSE	potok Kavuš, Bistrica selo	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	346
<i>A. torrentium</i> (20)	GK	Blate	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	426
<i>A. torrentium</i> (8)	GK	Dobra, Bukovska Gramaljska	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	308
<i>A. torrentium</i> (1)	GK	Bresni potok	<i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	5
<i>A. torrentium</i> (12)	GK	Skrad	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	104
<i>A. torrentium</i> (4)	GK	Curak, HE Zeleni vir	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	204
<i>A. torrentium</i> (5)	GK	Vele Vode	<i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	92
<i>A. torrentium</i> (7)	GK	Leskova draga	N.P.	-

<i>A. torrentium</i> (2)	LD	Orašnica, Guge, Knin	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	253
<i>A. torrentium</i> (2)	LD	Srebrenica, Sklop selo	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	82
<i>A. torrentium</i> (11)	LD	Kobilica	<i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	589
<i>A. torrentium</i> (2)	LD	Krasulja	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	228
<i>A. torrentium</i> (4)	LD	Zrmanja	<i>B. parasita</i>	64
<i>A. torrentium</i> (1)	SB	Rashane, Kosovo	<i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks N.I.	5
<i>A. torrentium</i> (24)	SB	Rijeka Crnojevica, Crna Gora	<i>B. hexodonta</i>	172
<i>A. torrentium</i> (2)	SB	Bitola	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	120
<i>A. torrentium</i> (3)	SB	Bošava	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	63
<i>A. torrentium</i> (3)	SB	Jakupica, Makedonija	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	41
<i>A. torrentium</i> (8)	ZV	Zeleni Vir	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	98
<i>A. torrentium</i> (5)	ŽPB	Sušik, polje Lug	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i>	23
<i>A. torrentium</i> (9)	ŽPB	Krakar, Krakarsko polje	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	19
<i>A. torrentium</i> (5)	ŽPB	Krakarski potok	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	127
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	Bojna, Banovina	N.P.	-
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	potok Ratković	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	127
<i>A. torrentium</i> (6)	ŽPB	bezimeni potok, pritoka Dretulje, Ralići	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	54
<i>A. torrentium</i> (3)	ŽPB	Drežnica	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	170
<i>A. torrentium</i> (1)	ŽPB	potok Krnjak, Brebornica	N.I.	2
<i>A. torrentium</i> (3)	ŽPB	potok Gradusa, Žabari	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	25
<i>A. pallipes</i> (5)	CARS	Rječina, Martinovo selo	<i>B. parasita</i>	14
<i>A. pallipes</i> (30)	CARS	Argila	<i>B. pentodonta</i> kompleks	86
<i>A. pallipes</i> (1)	CARS	Rječina, Kukuljani	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (36)	MER	Bračana	<i>B. astaci</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	148

<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Račica, Rimnjak	<i>B. astaci</i> <i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	92
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Mirna, Rušnjak	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	8
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Mirna, Kotli	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	117
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Butoniga, Kršlika	<i>B. astaci</i>	2
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Butoniga	<i>B. astaci</i> <i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	143
<i>A. pallipes</i> (26)	MER	Pivka	<i>B. pentodonta</i> kompleks	280
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Grdoselski potok	<i>B. pentodonta</i> kompleks	19
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Raša	<i>B. astaci</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	267
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	pritoka Butonige, Barušići	<i>B. pentodonta</i> kompleks	3
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Mirna, Motovunska šuma	<i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	47
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Otuča, Gračac	<i>B. hexodonta</i>	6
<i>A. pallipes</i> (6)	MER	Krušnica, blizu Mudrog vrila	<i>B. parasita</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	19
<i>A. pallipes</i> (5)	MER	potok kod Mudrog vrila, između Krušnice i Obsenice	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i>	62
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Rakovac, Lika	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Zrmanja	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	izvor Krupe	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	349
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Vransko jezero, lateralni kanal	<i>B. pentodonta</i> kompleks	170
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Sutina, Lučane	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Sutina	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	izvor Rude, Grab	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Drniš	<i>B. pentodonta</i> kompleks	108
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Vrba, Bračević	<i>B. pentodonta</i> kompleks	5
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Vrba, pritoka Čikole	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	potok Kotluša	<i>B. pentodonta</i> kompleks	306
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	Prološko jezero	<i>B. pentodonta</i> kompleks	53
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	kanjon Badnjevice	<i>B. pentodonta</i> kompleks	2
<i>A. pallipes</i> (2)	MER	Žutić, Dobrič, Mostarsko blato, BiH	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i>	40
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	izvor Žukovica, Posušje, BiH	<i>B. pentodonta</i> kompleks	7
<i>A. pallipes</i> (5)	MER	Vrioštica, BiH	<i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	29
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	izvor Jasle, PP Blidinje, BiH	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (3)	MER	Nezdravica Tihaljina, BiH	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (1)	MER	Mislina, Bijeli vir	N.P.	-
<i>A. pallipes</i> (4)	MER	pritoka Kopačice, Konavle	<i>B. pentodonta</i> kompleks	187

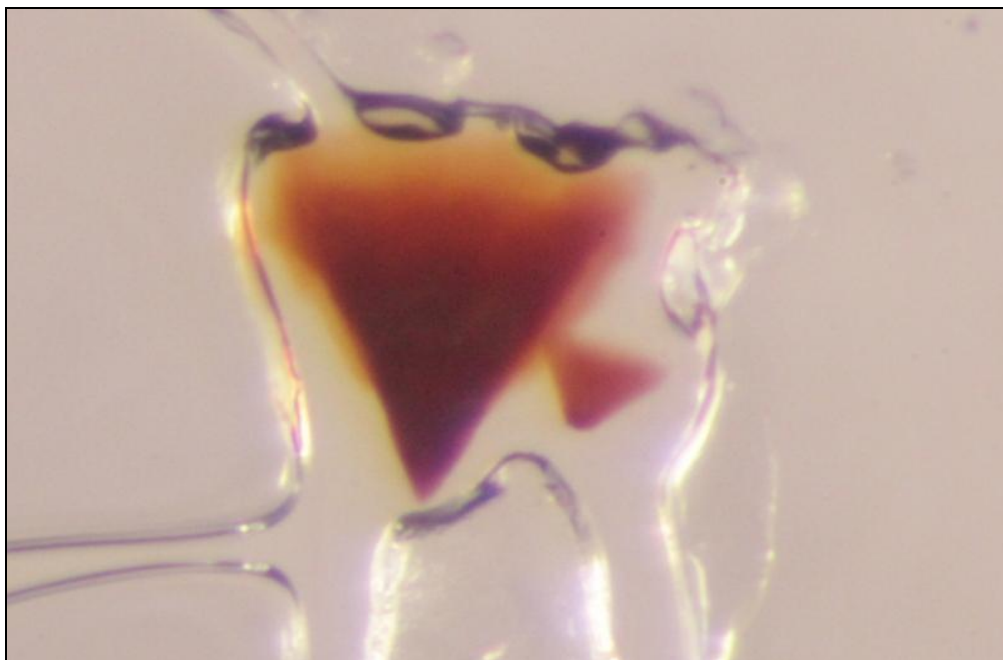
<i>A. pallipes</i> (36)	MER	rijeka Zeta, Danilovgrad, Crna Gora	<i>B. parasita</i> <i>B. hexodonta</i> <i>B. pentodonta</i> kompleks	125
-------------------------	-----	--	--	-----

Ukupno je izolirano 6830 jedinki branhiobdela. Pri tome je 3481 jedinka branhiobdela sakupljena iz alkohola iz posuda u kojima su se nalazile jedinke vrste *A. torrentium*. Prilikom pregledavanja škrge 186 jedinki vrste *A. torrentium* izolirano je 565 branhiobdela. U alkoholu iz posuda u kojima su bile konzervirane jedinke vrste *A. pallipes* izolirana je 2601 jedinka. Također, pregledane su škrge 193 jedinke vrste *A. pallipes* te je iz njih izolirano ukupno 183 branhiobdele (Tablica 6.).

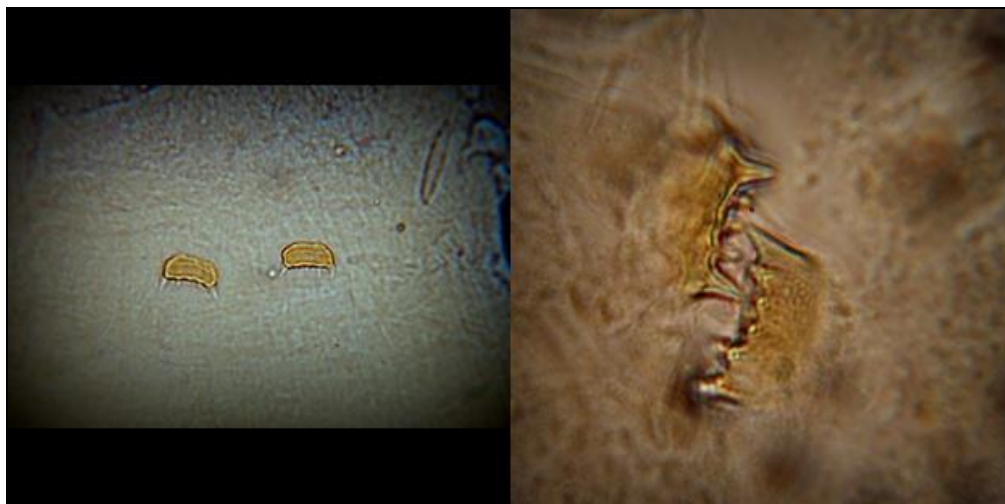
Tablica 6. Broj pronađenih branhiobdela u škragama i alkoholu u kojemu su bili konzervirani rakovi.

konzervirani rakovi:	<i>A. torrentium</i>		<i>A. pallipes</i>	
	Alkohol	Škrge	Alkohol	Škrge
	3481	565	2601	183
	4046		2784	
	Ukupno			
	6830			

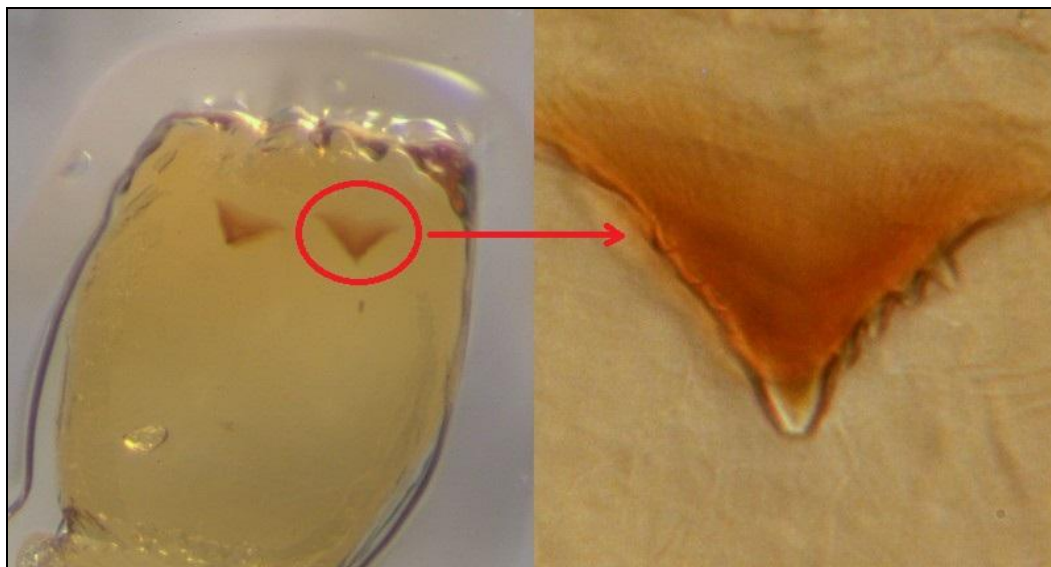
Od ukupnog broja izoliranih jedinki morfološki je determinirano njih 10,4 %, tj. 710 branhiobdela. Prema morfologiji čeljusti i obliku tijela determinirana je 41 jedinka vrste *B. astaci* (Slika 10.), 218 jedinki vrste *B. hexodonta* (Slika 11.), 93 jedinki vrste *B. parasita* (Slika 12.) te 358 jedinki *B. pentodonta* kompleksa (Slika 13.). Tri jedinke nije bilo moguće determinirati zbog loše vizualizacije čeljusti.



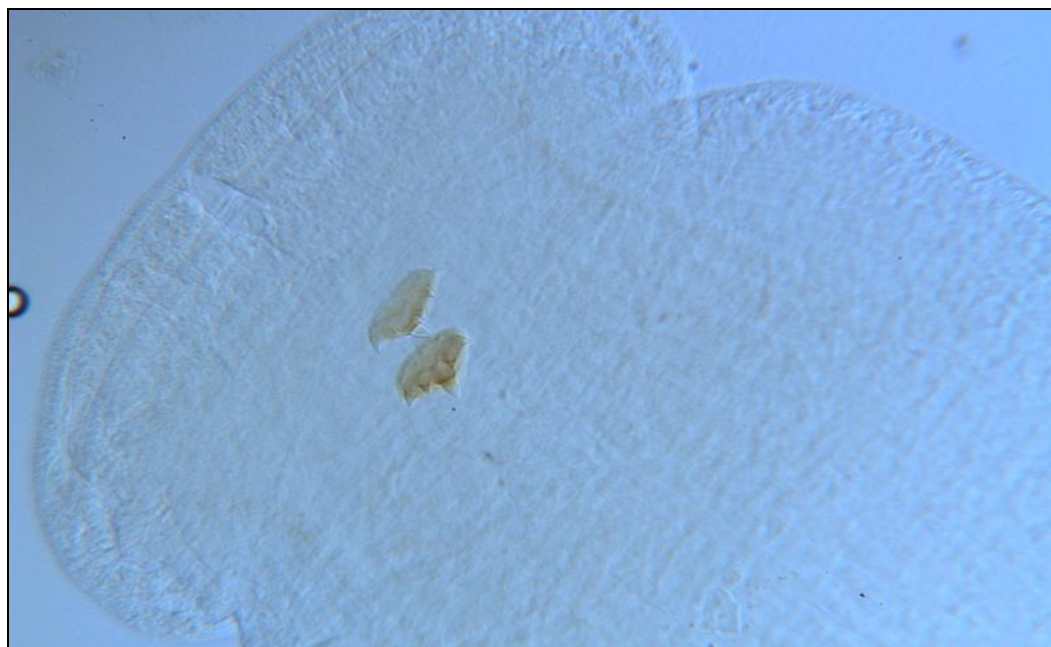
Slika 10. Dorzalna i ventralna hitinska čeljusti vrste *B. astaci*. Fotografirano pod stereomikroskopom pri povećanju 15X.



Slika 11. Dvije fotografije dorzalne i ventralne hitinske čeljusti vrste *B. hexodonta*. Lijeva fotografija prikazuje čeljusti pod mikroskopom pri povećanju 15X. Desna fotografija je slikana pri povećanju 40X te prikazuje detaljniju građu čeljusti.

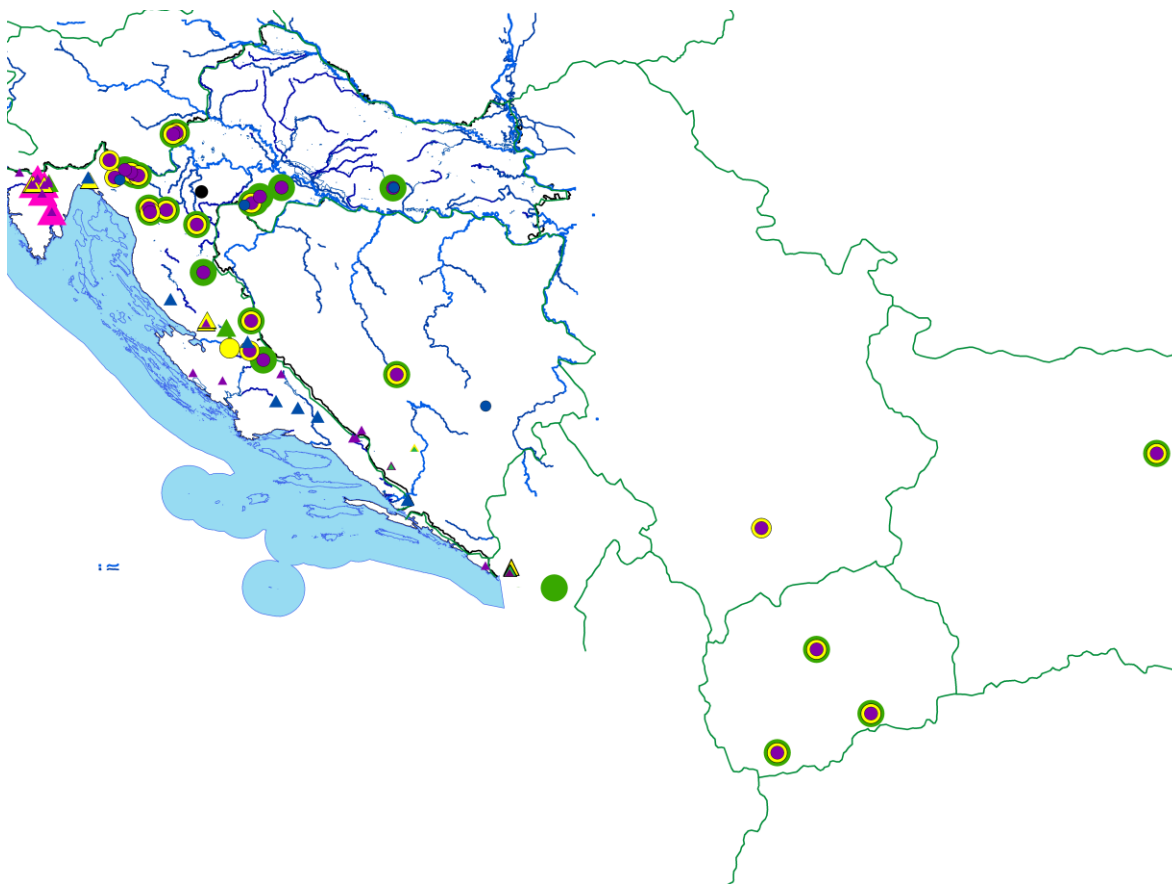


Slika 12. Hitinske čeljusti vrste *B. parasita*. Lijevo fotografija prikazuje dorzalnu i ventralnu hitinsku čeljust, fotografiranu pod stereomikroskopom pri povećanju 6X. Na desnoj fotografiji se nalazi uvećani prikaz jedne od čeljusti, kako bi se uočila nazubljenost. Fotografirano pod mikroskopom pri povećanju 15X.

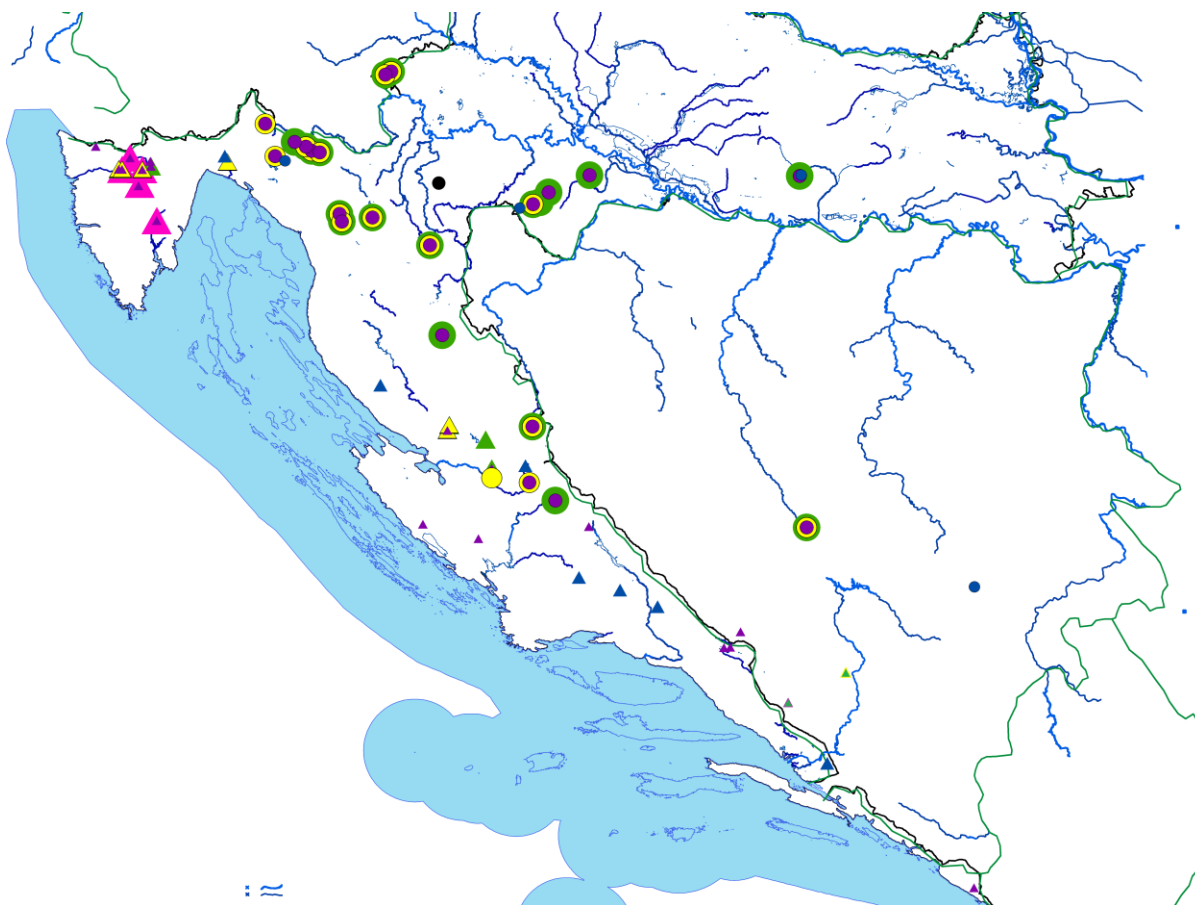


Slika 13. Dorzalna i ventralna hitinska čeljust vrste *B. pentodonta* kompleksa. Fotografirano pod mikroskopom pri povećanju 15X.

Na rakovima vrste *A. torrentium* pronađene su vrste *B. hexodonta*, *B. parasita* te vrste *B. pentodonta* kompleksa. Na rakovima vrste *A. pallipes* pronađene su vrste *B. astaci*, *B. hexodonta*, *B. parasita* i vrste *B. pentodonta* kompleksa. Karte rasprostranjenosti vrsta roda *Branchiobdella* napravljene u programu ArcGIS prikazane su na slikama 14. i 15.



Slika 14. Karta rasprostranjenosti vrsta roda *Branchiobdella*. Prikazani su lokaliteti u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Kosovu, Bugarskoj i Makedoniji. Pri tome su branhiobdele koje nalazimo na vrsti *A. pallipes* označene: *B. parasita* = ▲, *B. hexodonta* = ▲, *B. astaci* = ▲, *B. pentodonta* kompleks = ▲, nije pronađeno = ▲. Vrste branhiobdela koje nalazimo na vrsti *A. torrentium* označene su: *B. parasita* = ●, *B. hexodonta* = ●, *B. pentodonta* kompleks = ●, nije pronađeno = ●.



Slika 15. Karta rasprostranjenosti vrsta roda *Branchiobdella*. Prikazani su lokaliteti u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini. Pri tome su branhiobdele koje nalazimo na vrsti *A. pallipes* označene: *B. parasita* = ▲, *B. hexodonta* = ▲, *B. astaci* = ▲, *B. pentodonta* kompleks = ▲, nije pronađeno = ▲. Vrste branhiobdela koje nalazimo na vrsti *A. torrentium* označene su: *B. parasita* = ●, *B. hexodonta* = ●, *B. pentodonta* kompleks = ●, nije pronađeno = ●.

Zastupljenost pojedinih vrsta branhiobdela na rakovima prikazana je u Tablici 7. Unutar jedne populacije rakova pronađeno je do tri vrste branhiobdela (Tablica 8.).

Tablica 7. Zastupljenost pojedinih vrsta branhiobdela na rakovima, s obzirom na ukupni broj determiniranih branhiobdela po pojedinoj vrsti raka.

Vrste branhiobdela	Populacije rakova	
	<i>A. torrentium</i>	<i>A. pallipes</i>
<i>B. astaci</i>	-	12,7 %
<i>B. hexodonta</i>	44 %	15,6 %
<i>B. parasita</i>	15,8 %	11,3 %
<i>B. pentodonta</i> kompleks	37,9 %	60,1 %

Tablica 8. Koegzistencija različitih vrsta branhiobdela unutar jedne populacije rakova. Za pojedinu vrstu raka naznačeno je koliko je puta uočena određena koegzistencija.

Vrste branhiobdela	Populacije rakova	
	<i>A. torrentium</i>	<i>A. pallipes</i>
<i>B. parasita</i> + <i>B. pentodonta</i> kompleks	4	2
<i>B. parasita</i> + <i>B. hexodonta</i>	1	2
<i>B. pentodonta</i> kompleks + <i>B. hexodonta</i>	6	4
<i>B. pentodonta</i> kompleks + <i>B. astaci</i>	-	2
<i>B. parasita</i> + <i>B. hexodonta</i> + <i>B. pentodonta</i> kompleks	16	1
<i>B. parasita</i> + <i>B. astaci</i> + <i>B. pentodonta</i> kompleks	-	2

Također, na jedinci vrste *B. hexodonta* iz potoka Vučjak pronađen je epibiont-trepeljikaš iz roda *Epistylis* (Slika 16.).

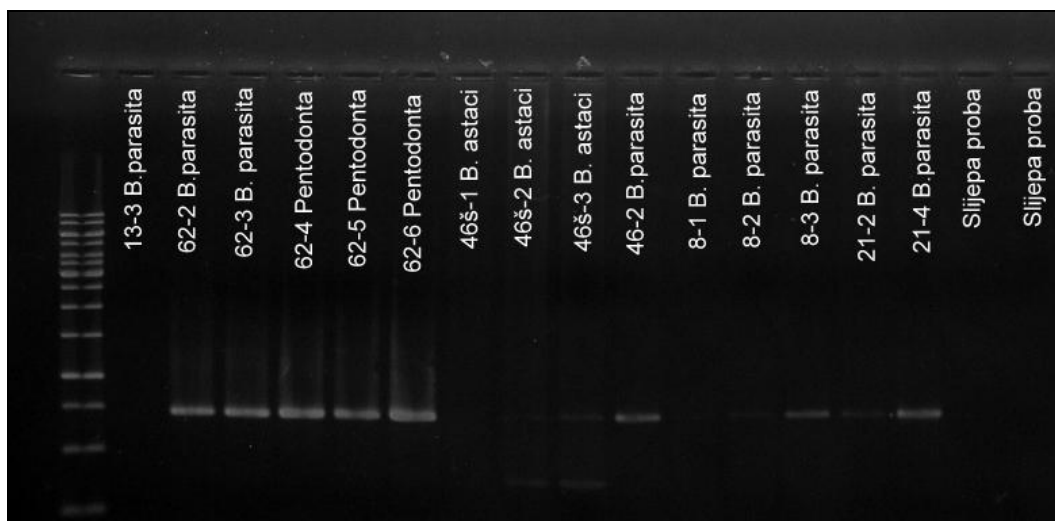


Slika 16. Jedinka vrste *B. hexodonta* na kojoj su pronađeni epibiont-trepeljikaši iz roda *Epistylis*, koji su označeni na slici. Fotografirano pod mikroskopom pri povećanju 15X.

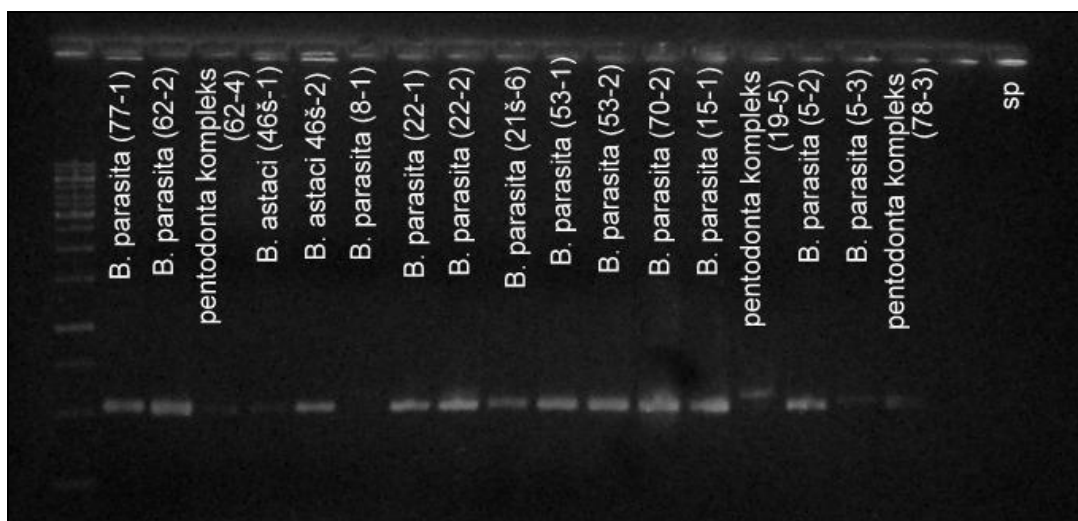
4.2. IZOLIRANA I UMNOŽENA DNA

Za potrebe molekularno-filogenetskih analiza, izolirana je DNA iz tkiva 186 jedinki branhiobdela. U pojedinim uzorcima koncentracija DNA je bila preniska pa oni nisu korišteni u daljnjim analizama. Jedinke korištene za umnažanje DNA putem PCR metode imale su koncentraciju DNA veću od 5 ng/μL. Na pročišćavanje i sekvenciranje je poslano ukupno 128 dobivenih PCR produkata - 70 uzoraka za gen za COI i 58 za gen za 16S rRNA (Slika 17., Slika 18.). Nakon pregleda dobivenih nukleotidnih sekvenci, u daljnjim analizama korišteno je ukupno njih 38 – 23 za gen za COI i 15 za gen za 16S rRNA.

Ostalih 90 nukleotidnih sekvenci nije korišteno u daljnjim analizama zbog kontaminacije uzoraka ili loše kvalitete samih sekvenci.



Slika 17. PCR produkti za gen za COI veličine otprilike 650 pb nakon elektroforeze i bojanja u etidijevom bromidu. U prvoj jažici nalazi se standard Gene Ruler 1 KB. U sljedećih 15 jažica nalaze se PCR produkti, naknadno označeni odgovarajućim šiframa. U posljednje dvije jažice nalazimo negativnu kontrolu, koja je na fotografiji označena „slijepa proba“.



Slika 18. PCR produkti za gen za 16S rRNA veličine otprilike 500 pb nakon elektroforeze i bojanja u etidijevom bromidu. U prvoj jažici nalazi se standard Gene Ruler 1 KB. U sljedećih 17 jažica nalaze se PCR produkti, naknadno označeni odgovarajućim šiframa. U posljednjoj jažici nalazimo negativnu kontrolu, koja je na fotografiji označena „sp“.

4.3. RAČUNALNE ANALIZE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

4.3.1. NUKLEOTIDNE SEKVENCE KORIŠTENE U MOLEKULARNO-FILOGENETSKOJ ANALIZI

Za gen za COI korištene su 23 eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence (Tablica 9.) i 53 nukleotidne sekvence vrsta iz roda *Branchiobdella* i vanjskih grupa, preuzete iz baze Genbank (Tablica 10.).

Tablica 9. Eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence za gen za COI korištene u molekularno-filogenetskim analizama. Haplotip rakova preuzet je iz rada Klobučar i sur. (2013), pri tome je GK- Gorski kotar, LD- Lika i Dalmacija, SB- južni Balkan, ŽPB- Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (za vrstu *A. torrentium*), CARS- carsicus, MER- meridionalis (za vrstu *A. pallipes*).

Vrsta	Naziv sekvence	Vrsta raka (haplogrupa)	Lokalitet
<i>B. hexodonta</i>	bh13_5	<i>A. torrentium</i> (GK)	Blate
<i>B. hexodonta</i>	bh13_9	<i>A. torrentium</i> (GK)	Blate
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk14_1	<i>A. torrentium</i> (LD)	Orašnice (Guge,Knin)
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk14_2	<i>A. torrentium</i> (LD)	Orašnice (Guge, Knin)
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk23_5	<i>A. pallipes</i> (MER)	Bračana
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk19_1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Mirna (Kotli)
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk19_5	<i>A. pallipes</i> (MER)	Mirna (Kotli)
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk19_7	<i>A. pallipes</i> (MER)	Mirna (Kotli)
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk46_9	<i>A. pallipes</i> (MER)	Butoniga
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk78_1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Kotluša
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk62_4	<i>A. torrentium</i> (ŽPB)	Ratković
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk62_5	<i>A. torrentium</i> (ŽPB)	Ratković
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk62_6	<i>A. torrentium</i> (ŽPB)	Ratković
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk13_10	<i>A. torrentium</i> (GK)	Blate
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk76_1	<i>A. pallipes</i> (CARS)	Argila
<i>B. pentodonta</i> kompleks	pk47_2	<i>A. torrentium</i> (SB)	Jakupica, Makedonija
<i>B. parasita</i>	bp8_3	<i>A. torrentium</i> (GK)	Dobra, Bukovska, Gramaljska
<i>B. parasita</i>	bp22_1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Račica, Rimnjak
<i>B. parasita</i>	bp46_2	<i>A. pallipes</i> (MER)	Butoniga
<i>B. parasita</i>	bp46_5	<i>A. pallipes</i> (MER)	Butoniga
<i>B. parasita</i>	bp62_2	<i>A. torrentium</i> (ŽPB)	Ratković
<i>B. parasita</i>	bp62_3	<i>A. torrentium</i> (ŽPB)	Ratković
<i>B. parasita</i>	bp70_1	<i>A. pallipes</i> (CARS)	Rječina, Martinovo selo

Tablica 10. Nukleotidne sekvence roda *Branchiobdella* i vanjskih grupa za gen za COI, preuzete iz baze Genbank, korištene u molekularno-filogenetskim analizama.

Vrsta	Naziv sekvence	Literaturni navod
<i>B. astaci</i>	BaJN204271	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204270	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204269	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204268	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204267	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204266	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204265	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204264	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. astaci</i>	BaJN204263	Rosewarne i sur. (2012)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655071	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655057	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655049	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655046	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655018	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655017	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655016	Füreder i sur. (2009)
<i>B. hexodonta</i>	bhFJ655015	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	AF310708Bpe	Gelder i Siddall (2001)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655067Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655063Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655059Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655058Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655056Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655053Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655042Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655041Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655034Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655029Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655025Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655024Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. pentodonta</i>	FJ655011Bpe	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655065	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655064	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655055	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655054	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655051	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655037	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655035	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655030	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655027	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655014	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655013	Füreder i sur. (2009)
<i>B. italica</i>	BitFJ655012	Füreder i sur. (2009)
<i>B. parasita</i>	bpAF310707	Gelder i Siddall (2001)
<i>B. parasita</i>	bpFJ655062	Füreder i sur. (2009)

<i>B. parasita</i>	bpFJ655048	Füreder i sur. (2009)
<i>B. parasita</i>	bpFJ655044	Füreder i sur. (2009)
<i>B. parasita</i>	bpFJ655039	Füreder i sur. (2009)
<i>B. parasita</i>	bpFJ655031	Füreder i sur. (2009)
<i>B. parasita</i>	bpFJ655021	Füreder i sur. (2009)
<i>H. medicinalis</i>	Hirudo	Füreder i sur. (2009)
<i>M. obscurus</i>	Mobscur	Williams i sur. (2013)
<i>T. magna</i>	TmagBC	Williams i sur. (2013)

U molekularno-filogenetskim analizama za gen za 16S rRNA korišteno je 15 eksperimentalno dobivenih nukleotidnih sekvenci (Tablica 11.) te tri sekvence vanjskih grupa (Tablica 12.).

Tablica 11. Eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence za gen za 16S rRNA korištene u molekularno - filogenetskim analizama. Haplotip rakova preuzet je iz rada Klobučar i sur. (2013), pri tome GK- Gorski kotar, LD- Lika i Dalmacija, SB- južni Balkan (za vrstu *A. torrentium*) i MER- meridionalis (za vrstu *A. pallipes*).

Vrsta	Naziv sekvence	Vrsta raka (haplogrupa)	Lokalitet
<i>B. astaci</i>	Ba46s1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Butoniga
<i>B. astaci</i>	Ba46s2	<i>A. pallipes</i> (MER)	Butoniga
<i>B. astaci</i>	Ba28s1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Raša
<i>B. astaci</i>	Ba28s2	<i>A. pallipes</i> (MER)	Raša
<i>B. astaci</i>	Ba28s4	<i>A. pallipes</i> (MER)	Raša
<i>B. parasita</i>	bp2_1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Žutič, BiH
<i>B. parasita</i>	bp2_2	<i>A. pallipes</i> (MER)	Žutič, BiH
<i>B. parasita</i>	bp15_1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Krušnica
<i>B. parasita</i>	bp22_1	<i>A. pallipes</i> (MER)	Račica, Rimnjak
<i>B. parasita</i>	bp22_2	<i>A. pallipes</i> (MER)	Račica, Rimnjak
<i>B. parasita</i>	bp5_1	<i>A. torrentium</i> (LD)	Srebrenica
<i>B. parasita</i>	bp5_2	<i>A. torrentium</i> (LD)	Srebrenica
<i>B. parasita</i>	bp7_1	<i>A. torrentium</i> (SB)	Rashane, Kosovo
<i>B. parasita</i>	bp8_3	<i>A. torrentium</i> (GK)	Dobra
<i>B. parasita</i>	bp46_5	<i>A. pallipes</i> (MER)	Butoniga

Tablica 12. Sekvence vanjskih grupa, preuzete iz baze Genbank, korištene u molekularno-filogenetskim analizama za gen za 16S rRNA.

Vrsta	Naziv sekvence	Literaturni navod
<i>H. medicinalis</i>	Hirudo	Halanych i sur. (2001)
<i>M. obscurus</i>	Mobscur	Williams i sur. (2013)
<i>T. magna</i>	TmagBC	Williams i sur. (2013)

4.3.2. SRAVNJENE NUKLEOTIDNE SEKVENCE

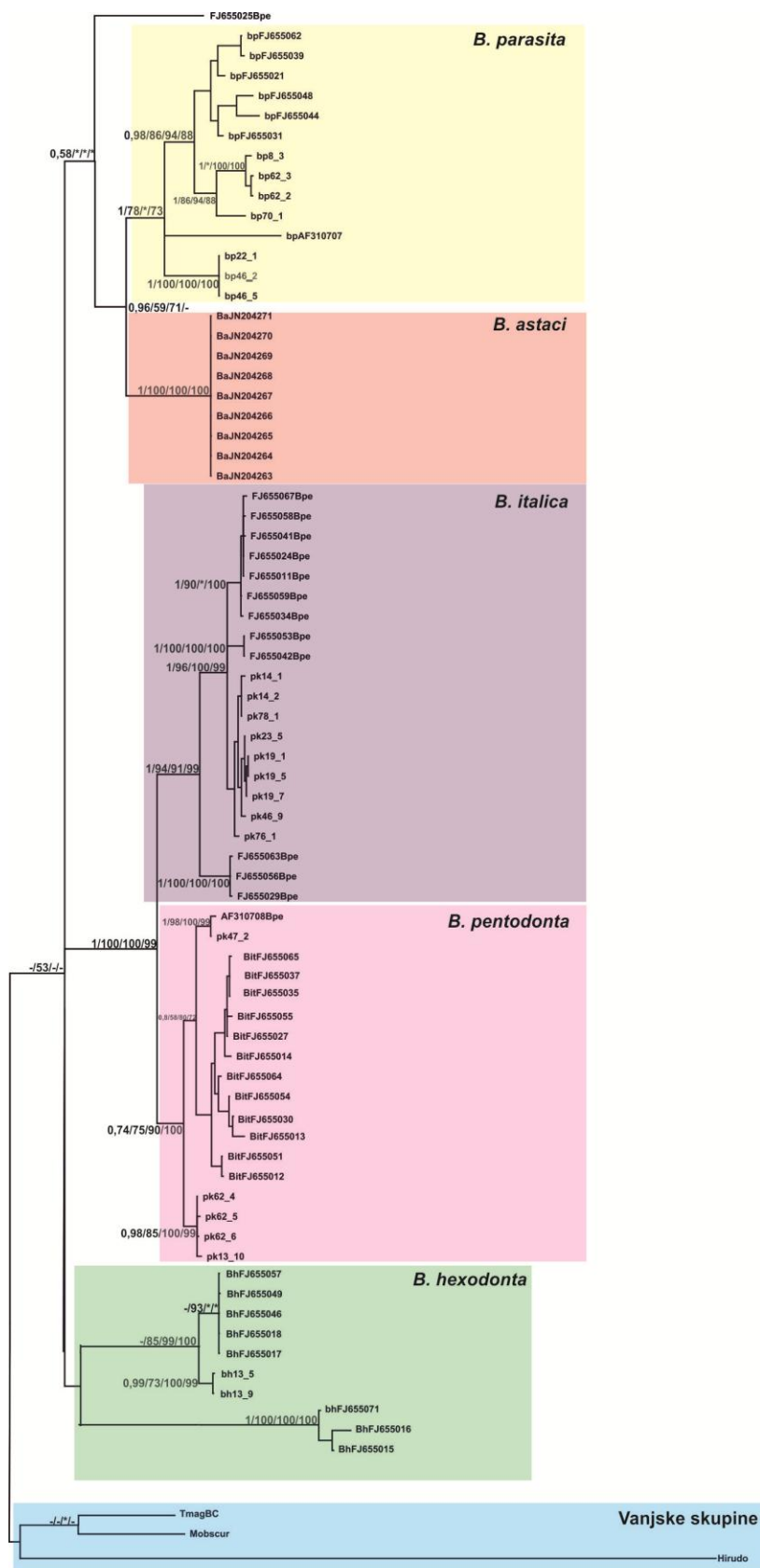
Prikaz sravnjenih sekvenci za gene za COI i 16S rRNA nalaze se u prilogima (Prilog 1., Prilog 2.). Ukupna duljina pojedinih nukleotidnih sekvenci za gen za COI iznosi 559 nukleotida (parova baza), dok za gen za 16S rRNA 420 nukleotida (parova baza).

4.3.3. FILOGENETSKE ANALIZE SRAVNJENIH SEKVENCI

Za svaki set podataka (COI i 16S rRNA) konstruirana su filogenetska stabla pomoću BA, ML, MP i NJ metoda.

Za gen za COI sve su metode konstruirale filogenetska stabla s gotovo istom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Stoga je u rezultatima prikazano filogenetsko stablo konstruirano BA metodom, koje prikazuje vrijednosti *posterior probability* podrške veće od 0,90 te vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 50 za ML metodu i veće od 70 za NJ i MP metode (Slika 19.). Filogenetska stabla konstruirana ML, MP i NJ metodama prikazana su u prilogima (Prilog 3., Prilog 4., Prilog 5.).

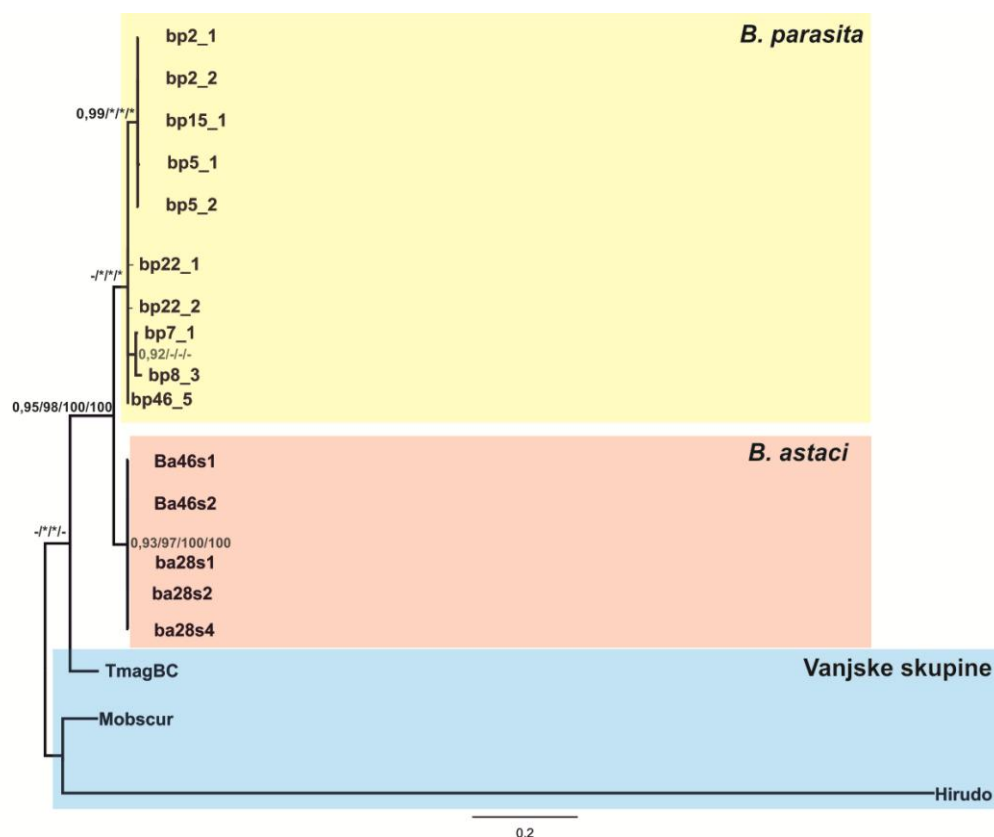
Sva filogenetska stabla ukorijenjena su vanjskim grupama. Na svim filogenetskim stablima uočeno je visoko podržano jasno odvajanje pet taksona: *B. hexodonta*, *B. pentodonta*, *B. italica*, *B. astaci* i *B. parasita*. Analizom nukleotidnih sekvenci, jedinke koje su na temelju morfoloških značajki determinirane kao „*B. pentodonta* kompleks“ su u svim dobivenim filogenetskim stablima jasno razdvojene u dva taksona – *B. italica* i *B. pentodonta*. Također, ova dva taksona su s visokom podrškom na svim filogenetskim stablima prikazana kao sestrinske skupine. Isto tako, u svim metodama su s visokom podrškom taksoni *B. astaci* i *B. parasita* prikazani kao sestrinske skupine. U stablima konstruiranim svim metodama unutar pojedinih taksona dolazi do visoko podržanih odvajanja zasebnih skupina, poglavito u taksonima *B. parasita* i *B. pentodonta*. Unutar taksona *B. parasita* uočeno je visoko podržano odvajanje skupine sekvenci „bp22_1, bp 46_2, bp 46_5” od ostalih sekvenci unutar taksona. Unutar taksona *B. pentodonta* uočeno je visoko podržano odvajanje skupine sekvenci „pk62_4, pk62_5, pk62_6, pk13_10“ od ostalih sekvenci unutar taksona.



Slika 19. BA filogenetsko stablo dobiveno analizom gena COI. Na granama su redom označene: vrijednosti *posterior probability* podrške BA metode, zatim *bootstrap* vrijednosti za ML, MP i NJ metode. Pri tome je „*“ = grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ = nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjera je 0,2 supstitucije).

Za gen za 16S rRNA sve su metode konstruirale stabla s gotovo istom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Stoga je u rezultatima prikazano filogenetsko stablo konstruirano BA metodom, koje prikazuje vrijednosti *posterior probability* podrške veće od 0,90 te vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 50 za ML metodu i veće od 70 za NJ i MP metode (Slika 20.). Filogenetska stabla konstruirana ML, MP i NJ metodama prikazana su u prilogima (Prilog 6., Prilog 7., Prilog 8.).

Sva filogenetska stabla ukorijenjena su vanjskim grupama. Na svim filogenetskim stablima uočeno je visoko podržano odvajanje taksona *B. astaci* i *B. parasita*.



Slika 20. BA filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA. Na granama su redom označene vrijednosti *posterior probability* podrške za BA metodu, zatim vrijednosti *bootstrap* podrške za ML, MP i NJ metode. Pri tome je „*“ = grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ = nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjera je 0,2 supstitucije).

4.3.4. GENETSKE UDALJENOSTI NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

Iz dobivenih vrijednosti p-distanca za gen za COI izračunate su prosječne vrijednosti te njihov raspon unutar i između pojedinih taksona, koji su na filogenetskom stablu odvojeni kao zasebne skupine (Tablica 13.).

Tablica 13. Prikaz prosječnih vrijednosti p-distanca za gen za COI unutar i između pojedinih taksona. U zagradama je prikazan raspon vrijednosti.

	<i>B. parasita</i>	<i>B. astaci</i>	<i>B. pentodonta</i>	<i>B. italica</i>	<i>B. hexodonta</i>
<i>B. parasita</i>	0,093 (0,000 - 0,184)				
<i>B. astaci</i>	0,160 (0,118 - 0,201)	0,000			
<i>B. pentodonta</i>	0,206 (0,154 - 0,250)	0,201 (0,185 - 0,219)	0,036 (0,000 - 0,072)		
<i>B. italica</i>	0,218 (0,180 - 0,258)	0,214 (0,186 - 0,230)	0,122 (0,089 - 0,228)	0,049 (0,000 - 0,195)	
<i>B. hexodonta</i>	0,194 (0,127 - 0,249)	0,183 (0,145 - 0,233)	0,197 (0,168 - 0,264)	0,218 (0,182 - 0,268)	0,099 (0,000 - 0,209)

Unutar taksona *B. parasita* prosječna vrijednost p-distance (0,093) te raspon (0,000 – 0,184) su visoki. Također, unutar tog taksona je na filogenetskom stablu uočeno visoko podržano odvajanje skupine sekvenci “bp22_1, bp46_2, bp46_5” od ostalih sekvenci unutar taksona (Slika 19.). Stoga je između te skupine sekvenci i svih ostalih sekvenci taksona *B. parasita* izračunata prosječna vrijednost p-distance i njen raspon (Tablica 14.). Između skupine sekvenci “bp22_1, bp46_2, bp46_5” i svih ostalih sekvenci unutar taksona *B. parasita* prosječna vrijednost p-distance i raspon su visoki.

Tablica 14. Prikaz prosječnih vrijednosti p-distanca za gen za COI između skupine sekvenci “bp22_1, bp 46_2, bp 46_5” i ostalih sekvenci unutar taksona *B. parasita*. U zagradama je prikazan raspon vrijednosti p-distanci.

	<i>B. parasita</i> (sve)	bp22_1, bp46_2, bp46_5
<i>B. parasita</i> (sve)	0,093 (0,000 - 0,184)	
bp22_1, bp46_2, bp46_5	0,120 (0,902 - 0,165)	0,000

Na filogenetskom stablu je unutar taksona *B. pentodonta* uočeno dobro podržano odvajanje skupine sekvenci “pk62_4, pk62_5, pk62_6, pk13_10” od skupine sekvenci „pk47_2, AF310708Bpe“ i referentnih sekvenci (Slika 19.). Stoga je između tih skupina sekvenci izračunata prosječna vrijednost p-distance te raspon vrijednosti p-distance (Tablica 15.).

Tablica 15. Prikaz prosječnih vrijednosti p-distance za gen za COI između skupine sekvenci “pk62_4, pk62_5, pk62_6, pk13_10” i “pk47_2, AF310708Bpe” i referentnih sekvenci. U zagradama je prikazan raspon vrijednosti.

	<i>B. pentodonta</i> (svi)	pk62_4, pk62_5, pk62_6, pk13_10	pk47_2, AF310708Bpe
<i>B. pentodonta</i> (svi)	0,041 (0,000 - 0,072)		
pk62_4, pk62_5, pk62_6, pk13_10	0,055 (0,032 - 0,072)	0,005 (0,002 - 0,008)	
pk47_2, AF310708Bpe	0,047 (0,036 - 0,064)	0,042 (0,032 - 0,051)	0,002

Iz dobivenih vrijednosti p-distanci za gen za 16S rRNA, izračunate su prosječne vrijednosti te njihov raspon unutar i između sekvenci taksona *B. astaci* i *B. parasita*, koji su na filogenetskom stablu odvojeni kao zasebne skupine (Tablica 16.). Prosječna vrijednost p-distance između taksona *B. parasita* i *B. astaci* je 0,40. Unutar taksona *B. parasita* prosječna vrijednost p-distance je 0,009, s rasponom od 0,000 do 0,021. Unutar taksona *B. astaci* dobivena vrijednost p-distance ukazuje da ne postoje značajne razlike u nukleotidnim sekvencama.

Tablica 16. Prikaz prosječnih vrijednosti p-distance za gen za 16S rRNA između sekvenci taksona *B. parasita* i *B. astaci*. U zagradama je prikazan raspon vrijednosti.

	<i>B. parasita</i>	<i>B. astaci</i>
<i>B. parasita</i>	0,009 (0,000 - 0,021)	
<i>B. astaci</i>	0,040 (0,032 - 0,045)	0,000

5. RASPRAVA

5.1. MORFOLOŠKA DETERMINACIJA I RASPROSTRANJENOST RODA *Branchiobdella*

Morfološkom determinacijom utvrđena je prisutnost najmanje četiri vrste branhiobdela na rakovima roda *Austropotamobius* u Hrvatskoj. Pronađene su vrste *B. astaci*, *B. hexodonta*, *B. parasita* te *B. pentodonta* kompleks. Pri tome se pod nazivom „*B. pentodonta* kompleks“ smatraju jedinke vrste ili *B. italica* ili *B. pentodonta*. Ove dvije vrste nije u potpunosti moguće razlikovati samo na temelju morfologije čeljusti, već se u determinaciji koristi i usporedba dijela muškog spolnog sustava, što u ovom istraživanju nije bilo moguće provesti jer se upotrebljavao konzervirani materijal (Gelder, 1994).

Metoda uklapanja glava branhiobdela u Hoyerovoj otopini, radi lakše vizualizacije čeljusti i morfološke determinacije, je prvi puta korištena u ovom istraživanju. Metoda se pokazala iznimno uspješnom jer je proces uklapanja i uprozirnavanja tkiva znatno brži nego u prijašnjim istraživanjima, u kojima je jedinke prije samog uklapanja bilo potrebno dehidrirati u rastućim koncentracijama otopina etanola, uprozirnuti pomoću metil salicilata te uklopiti kanada balzomom (Gelder i sur., 1994, 1999; Klobučar i sur., 2006).

U ovom istraživanju, vrsta *B. parasita* je pronađena kao epibiont na obje vrste raka iz roda *Austropotamobius*. Prilikom istraživanja raznolikosti i distribucije branhiobdela u Hrvatskoj, Klobučar i sur. (2006) ovu su vrstu pronašli samo na vrsti *A. torrentium*. Stoga je ovo prvi nalaz vrste *B. parasita* na raku *A. pallipes* u Hrvatskoj. Vrsta *B. astaci* pronađena je samo na vrsti *A. pallipes* i to samo u populacijama u Istri. Ovaj nalaz podudara se s rezultatima istraživanja od Klobučar i sur. (2006). Također, zanimljivo je da vrste *B. astaci* i *B. hexodonta*, koje nastanjuju škržnu šupljinu rakova, nikada nisu pronađene na istim lokalitetima u Hrvatskoj. Razlog tome može biti zauzimanje iste ekološke niše, koja je prostorno vrlo ograničena. Vrste *B. hexodonta* i *B. pentodonta* kompleks pronađene su na obje vrste raka iz roda *Austropotamobius*, što je utvrđeno i u istraživanju od Klobučar i sur. (2006). Također, potrebno je naglasiti kako je u Hrvatskoj u prijašnjim istraživanjima potvrđena prisutnost vrste *B. balcanica* (Klobučar i sur., 2006). No, ta vrsta je pronađena samo na rakovima vrste *Astacus astacus*, stoga ne

čudi kako nije zabilježena u ovom istraživanju. Od autohtonih europskih vrsta branhiobdela u Hrvatskoj za sada nije utvrđena samo vrsta *B. kozarovi*, kojoj je prema dosadašnjim istraživanjima zapadna granica rasprostranjenja Bugarska (Subchev, 1978; Subchev i Stanimirova, 1997).

Ovako velika raznolikost faune branhiobdela u Hrvatskoj podudara se s istraživanjima provedenim i u okolnim državama. Prema Karaman (1967) vrste *B. parasita*, *B. hexodonta*, *B. pentodonta* i *B. balcanica* prisutne su u Sloveniji, Srbiji, Bosni i Hercegovini (izuzev vrste *B. balcanica*) te Makedoniji. Ove četiri vrste također su prisutne u Slovačkoj (Halgoš, 1972) i Austriji (Nesemann, 1994). Zajedno s vrstom *B. astaci*, ove vrste također nalazimo u Mađarskoj i Bugarskoj (Subchev, 1984; Subchev i Stanimirova, 1997). U sjevernoj Italiji prema Oberkofler i sur. (2002) nalazimo vrste *B. hexodonta*, *B. italica*, *B. parasita* i *B. astaci*, ali i američke vrste branhiobdela - vrste *Xironogiton victoriensis* (Quaglio i sur., 2002) i *Cambarincola mesochoreus* (Gelder i sur., 1999), koje su najvjerojatnije prešle sa stranih introduciranih američkih vrsta rakova na native.

Ovim istraživanjem, utvrđeno je 50 novih lokaliteta na kojima su pronađene branhiobdele na rakovima roda *Austropotamobius* u Hrvatskoj. Ovi podaci, zajedno s lokalitetima iz rada Klobučar i sur. (2006.), predstavljaju za sada najpotpuniji prikaz rasprostranjenosti branhiobdela u Hrvatskoj.

Osim lokaliteta u Hrvatskoj, prilikom ovog istraživanja pregledani su i rakovi roda *Austropotamobius* sakupljeni u Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Makedoniji i Bugarskoj. U Bosni i Hercegovini, Bugarskoj i Makedoniji morfološkom determinacijom utvrđena je prisutnost vrsta *B. hexodonta*, *B. pentodonta* kompleks i *B. parasita*, što se podudara s prethodnim istraživanjima (Karaman, 1967; Subchev, 1984; Subchev i Stanimirova, 1997). U Crnoj Gori također su utvrđene vrste *B. hexodonta*, *B. pentodonta* kompleks i *B. parasita*. Pri tome je u prijašnjim istraživanjima utvrđena prisutnost vrsta *B. hexodonta* i *B. pentodonta* kompleks u toj državi (Gelder, 1999; Šundić i Radujković, 2012), dok je za vrstu *B. parasita* ovo prvi nalaz u Crnoj Gori.

5.2. MOLEKULARNA FILOGENIJA RODA *Branchiobdella*

Kako bi se utvrdili molekularno–filogenetski odnosi između vrsta roda *Branchiobdella*, korištene su analize dva mitohondrijska genska markera – za COI i 16S rRNA. Za gen za COI, kvalitetne nukleotidne sekvence dobivene su za sve vrste morfološki determiniranih *branchiobdella*, osim za vrstu *B. astaci*. Za gen za 16S rRNA kvalitetne sekvence dobivene su samo za vrste *B. parasita* i *B. astaci*.

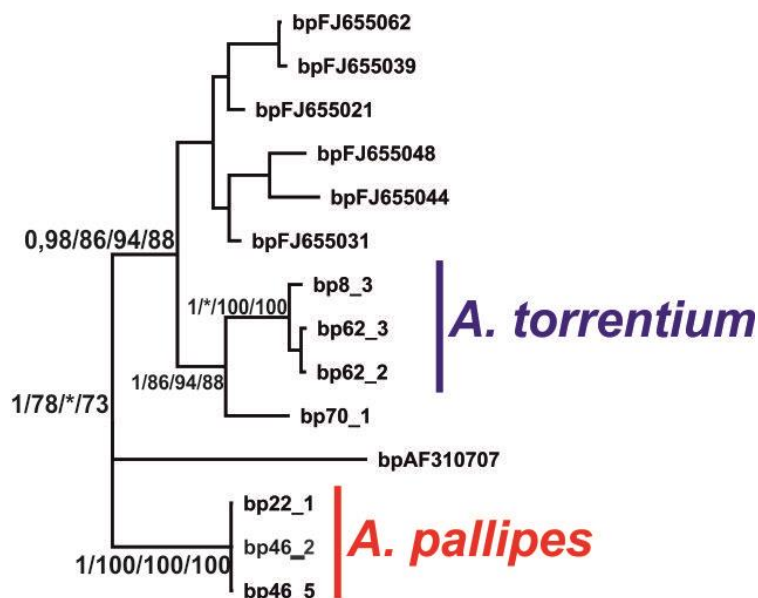
Za gen za COI sve su metode konstruirale filogenetska stabla s gotovo istom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Rezultati molekularno–filogenetskih analiza potvrdili su rezultate determinacije temeljene na morfologiji jer je na svim filogenetskim stablima uočeno visoko podržano i jasno odvajanje pet taksona: *B. hexodonta*, *B. pentodonta*, *B. italica*, *B. astaci* i *B. parasita* (Slika 19.). Rezultati ukazuju na monofiletsko podrijetlo svih taksona.

Vrste *B. italica* i *B. pentodonta* nije bilo moguće razlikovati na temelju morfologije čeljusti te su u prvom dijelu rezultata navedene kao *B. pentodonta* kompleks, no molekularno–filogenetskim analizama unutar kompleksa su jasno odvojene kao zasebne vrste. One se također na filogenetskom stablu smještaju kao sestrinske skupine, što ne čudi s obzirom na njihovu morfološku sličnost i spoznaje dobivene prijašnjim istraživanjem (Füreder i sur., 2009). Usporedbom rezultata molekularno–filogenetskih analiza i geografske distribucije ovih vrsta (Slika 14., Slika 15., Slika 19.) utvrđeno je kako je vrsta *B. pentodonta* epibiont samo na vrsti *A. torrentium*, i to u onim populacijama koje se nalaze u unutrašnjosti Hrvatske. Vrsta *B. italica* prisutna je i na vrsti *A. pallipes*, a utvrđena je i na vrsti *A. torrentium*, ali samo u onim populacijama koje su rasprostranjene u rijekama jadranskog sliva. Isto tako, Klobučar i sur. (2006) u svom istraživanju su utvrdili vrstu *B. italica* samo na raku *A. pallipes*, dok je vrsta *B. pentodonta* pronađena na populacijama rakova *A. torrentium* iz unutrašnjosti Hrvatske. Također, Karaman (1967) te Subchev i Stanimirova (1997) u svojim istraživanjima dolaze do sličnih zaključaka. Stoga možemo reći da je ovim istraživanjem po prvi puta utvrđen nalaz vrste *B. italica* na raku vrste *A. torrentium* u Hrvatskoj. U konstruiranim filogenetskim stablima, sekvence *B. pentodonta* kompleksa, dobivene ovim istraživanjem, koje su pronađene na vrsti *A. torrentium* iz unutrašnjost Hrvatske i referentna sekvenca vrste *B. pentodonta* „AF310708Bpe” (Gelder i Siddall, 2001) s

visokom su podrškom grupirane s referentnim sekvencama iz rada Füreder i sur. (2009), koje su navedene kao vrsta *B. italica*. Isto tako, eksperimentalno dobivene sekvence *B. pentodonta* kompleksa koje su pronađene na vrsti *A. pallipes* i vrsti *A. torrentium* iz jadranske regije, na filogenetskom stablu su s visokom podrškom grupirane s referentnim sekvencama iz rada Füreder i sur. (2009), koje su navedene kao vrsta *B. pentodonta*. Stoga je u istraživanju Füreder i sur. (2009) vjerojatno došlo do pogreške te su vrste *B. italica* i *B. pentodonta* krivo morfološki determinirane, odnosno krivo imenovane u filogenetskim stablima. Budući da je istraživanje Füreder i sur. (2009) prvo koje je utvrdilo molekularno-filogenetske odnose europskih vrsta branhiobdela, vjerojatno je zbog nepostojanja referentnih sekvenci došlo do pogreške prilikom determinacije vrsta unutar *B. pentodonta* kompleksa.

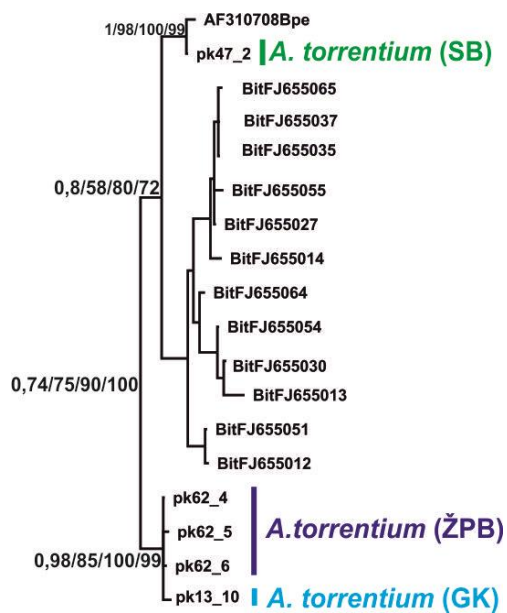
Na filogenetskom stablu se vrste *B. parasita* i *B. astaci* grupiraju kao sestrinske skupine. Ovakav rezultat dobiven je i u istraživanju Rosewarne i sur. (2012). Također, ove dvije vrste su morfološki slične - obje u adultnoj fazi imaju veće tijelo nego ostale vrste iz roda *Branchiobdella* i čeljusti u kojima je jedan zub dominantan. Pri tome je kod vrste *B. astaci* jedna čeljust bitno veća od druge (Slika 12.), dok su kod vrste *B. parasita* (Slika 14.) čeljusti podjednake veličine.

U stablima konstruiranim svim metodama, u taksonima *B. parasita* i *B. pentodonta* dolazi do visoko podržanih odvajanja zasebnih podgrupa. Unutar taksona *B. parasita* uočeno je visoko podržano odvajanje skupine sekvenci „bp22_1, bp46_2, bp46_5”, koje su pronađene na vrsti *A. pallipes*, od ostalih eksperimentalno dobivenih sekvenci branhiobdela koje su pronađene na vrsti *A. torrentium* (Slika 21.). Sekvenca “bp70-1” doduše pripada vrsti *B. parasita* koja je pronađena na vrsti *A. pallipes*, ali se grupira s jedinkama pronađenim na vrsti *A. torrentium*. Razlog ovome je vjerojatno manja kvaliteta same sekvence, a ne bliže srodstvo s ostalim sekvencama.



Slika 21. Visoko podržano odvajanje eksperimentalno dobivenih nukleotidnih sekvenci unutar vrste *B. parasita* s obzirom na vrstu rakova na kojoj su jedinice pronađene. Na granama filogenetskog stabla redom su označene vrijednosti *posterior probability* podrške za BA metodu, zatim vrijednosti *bootstrap* podrške za ML, MP i NJ metode. Pri tome je „*“ = grananje ne postoji u određenoj metodi.

Unutar taksona *B. pentodonta* uočeno je visoko podržano odvajanje skupine eksperimentalno dobivenih sekvenci „pk62_4, pk62_5, pk62_6, pk13_10“ od eksperimentalno dobivene sekvence „pk47_2“ (Slika 22.). Naime, jedinice prve skupine sakupljene su na rakovima vrste *A. torrentium*, čije su haplogrupe prema Klobučar i sur. (2013) „Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (ŽPB)“ i „Gorski Kotar (GK)“. Ove dvije haplogrupe su, prema navedenom istraživanju, srodstveno bliske. Jedinica branhiobdele „pk47_2“ sakupljena je s raka vrste *A. torrentium* iz Makedonije te prema Klobučar i sur. (2013) ovaj rak pripada haplogrupi „južni Balkan (SB)“. Stoga je uočeno kako bi se branhiobdele, koje pripadaju taksonu *B. pentodonta*, mogle odvajati u haplogrupe na sličan način kao i njihovi domadari.



Slika 22. Visoko podržano odvajanje eksperimentalno dobivenih nukleotidnih sekvenci unutar vrste *B. pentodonta* s obzirom na haplogrupu raka vrste *A. torrentium* s kojeg su sakupljene. Pri tome je ŽPB = Žumberak, Plitvice, Bjelolasica, GK = Gorski kotar, SB = južni balkan. Na granama stabla redom su označene vrijednosti *posterior probability* podrške za BA metodu, zatim vrijednosti *bootstrap* podrške za ML, MP i NJ metode.

Za gen za 16S rRNA sve su metode konstruirale filogenetska stabla s gotovo istom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Eksperimentalno dobivene sekvence u ovom istraživanju, prve su sekvence gena za 16S rRNA za rod *Branchiobdella*. Analizama ovog gena, vrste *B. parasita* i *B. astaci* također su prikazane kao sestrinske skupine. Nukleotidne sekvence za gen za 16S rRNA su vjerojatno dobivene samo za ove dvije vrste jer im se nukleotidne sekvence uvelike ne razlikuju zbog bliskog srodstva. Stoga, za dobivanje kvalitetnih nukleotidnih sekvenci za vrste *B. hexodonta* i *B. pentodonta* kompleksa trebalo bi konstruirati nove, specifičnije početnice za gen za 16S rRNA.

5.3. GENETSKE UDALJENOSTI UNUTAR RODA *Branchiobdella*

Osim konstrukcije filogenetskih stabala, molekularno–filogenetski odnosi između vrsta roda *Branchiobdella* utvrđeni su i izračunom p-distance, koja prikazuje genetske udaljenosti između pojedinih sekvenci.

Za gen za COI dobivene prosječne vrijednosti p-distance između vrsta su visoke. Najmanja prosječna vrijednost p-distance je između vrsta *B. italica* i *B. pentodonta*, koje

su na temelju morfologije i molekularno-filogenetske analize prikazane kao blisko srodne, sestrinske skupine. Za vrste *B. parasita* i *B. astaci*, koje su također morfološki slične i na temelju molekularno-filogenetske analize prikazane kao sestrinske skupine, prosječna vrijednost p-distance je manja nego u njihovoj usporedbi s drugim taksonima.

Vrlo visoku prosječnu vrijednost p-distance nalazimo unutar vrste *B. parasita*, kod koje je na filogenetskom stablu uočeno već spomenuto odvajanje jedinki pronađenih na vrsti *A. pallipes* od jedinki pronađenih na vrsti *A. torrentium*. Ovo odvajanje je podržano i izračunom prosječne vrijednosti p-distance. Naime, prosječna vrijednost p-distance jedinki pronađenih na raku *A. pallipes*, razlikuje se čak 12 % od ostalih jedinki vrste *B. parasita*. Ova razlika jednaka je razlici u prosječnoj vrijednosti p-distance između vrsta *B. italica* i *B. pentodonta*. Stoga bi se jedinke pronađene na vrsti *A. pallipes* mogle smatrati novom podvrstom unutar vrste *B. parasita* ili čak novom vrstom. No, u budućnosti je potrebno provesti dodatno istraživanje s većim brojem jedinki i drugim genskim markerima, kako bi se detaljno utvrdio taksonomski status utvrđene podgrupe.

Također, izračunate su prosječne vrijednosti p-distance unutar vrste *B. pentodonta*, budući da je na filogenetskom stablu jasno uočeno odvajanje jedinki koje nalazimo na vrsti *A. torrentium*, haplogrupe ŽPB i GK te jedinki koje nalazimo na istoj vrsti raka, ali haplogrupe SB. Prosječna vrijednost p-distance je 4,2 %. Ova vrijednosti i odvajanje ovih skupina na filogenetskom stablu, zajedno potvrđuju činjenicu kako bi se branhiobdele mogle odvajati u haplogrupe na sličan način kao i njihovi domadari, odnosno da je specijacija branhiobdela najvjerojatnije slijedila specijaciju rakova iz roda *Austropotamobius*.

Za gen za 16S rRNA također su izračunate prosječne vrijednosti p-distance. Prema ovoj metodi, vrste *B. astaci* i *B. parasita* razlikuju se u svojim nukleotidnim sekvencama 4 %. Iako je za potrebe ovog istraživanja pripremljeno mnogo PCR produkata za gen za 16S rRNA, nisu dobivene kvalitetne sekvence. Iznimka su, kao što je već prethodno spomenuto, vrste *B. astaci* i *B. parasita*. Stoga, u budućim istraživanjima, a kako bi se dobio veći broj kvalitetnih sekvenci za 16S rRNA, bilo bi neophodno razviti nove specifične početnice za ovaj gen. Na taj način bi vjerojatno buduće analize upotpunile rezultate dobivene ovim istraživanjem.

6. ZAKLJUČAK

- Rezultati morfološke determinacije i molekularno-filogenetskih analiza potvrdile su postojanje pet vrsta branhiobdela koje žive kao epibionti na rakovima roda *Austropotamobius* u Hrvatskoj. To su vrste *B. astaci*, *B. hexodonta*, *B. parasita*, *B. pentodonta* i *B. italica*.
- Utvrđeno je 50 novih lokaliteta na kojima su pronađene branhiobdele na rakovima roda *Austropotamobius* u Hrvatskoj.
- Unutar vrste *B. parasita* (upotrebom gena za COI) odvajaju se, jasno i visoko podržano, dvije podgrupe; jedinke koje žive na rakovima vrste *A. torrentium* i jedinke koje žive na vrsti *A. pallipes*.
- Razlike u nukleotidnim sekvencama (p-distance) između te dvije podgrupe su visoke te bi u budućnosti trebalo provesti istraživanje s više jedinki i drugih genskih markera, kako bi se utvrdilo jesu li uočene podgrupe zasebne podvrste unutar vrste *B. parasita* ili čak zasebne vrste.
- Unutar vrste *B. pentodonta* (upotrebom gena za COI) također dolazi do visoko podržanog i jasnog odvajanja jedinki koje su epibionti na različitim haplogrupama vrste *A. torrentium*.
- Na temelju molekularno-filogenetskih rezultata dobivenih upotrebom gena za COI, evolucijski odnosi između vrsta *B. italica* i *B. pentodonta* te unutar vrste *B. parasita* ukazuju kako su vrlo vjerojatno isti procesi koji su doveli do razdvajanja rakova vrsta *A. pallipes* i *A. torrentium* utjecali i na specijaciju branhiobdela. Stoga se može zaključiti da je izdizanje Dinarida, osim na specijaciju rakova roda *Austropotamobius* u Hrvatskoj, vjerojatno uzrokovalo i specijaciju njihovih epibionata – branhiobdela.
- Evolucijski odnosi unutar vrste *B. pentodonta* ukazuju kako bi se branhiobdele mogle odvajati u haplogrupe na isti način kao i njihovi domadari, odnosno da je specijacija branhiobdela najvjerojatnije slijedila specijaciju vrste *A. torrentium*.
- Korištene početnice za genski marker za 16S rRNA nisu umnožile kvalitetne sekvence za sve analizirane vrste branhiobdela. Stoga bi se za buduća istraživanja trebalo konstruirati nove i specifičnije početnice za gen za 16S rRNA za branhiobdele.

7. LITERATURA

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Brown B.L., Creed R.P., Dobson W.E. 2002. Branchiobdellid annelids and their crayfish hosts: are they engaged in a cleaning symbiosis? *Oecologia* **132**, 250–255.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **9** (8), 772.
- Erséus C., Kallersjö M. 2003. 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zool. Scr.* **33**, 187-196.
- Evans L.H. i Edgerton B.F. 2001. Pathogens, parasites and commensals. U: Holdich D.M.(ur.), *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, str. 377-438.
- Fard A.N. i Gelder S.R. 2011. First report of *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 (Annelida: Clitellata) in Iran, and its distribution in the eastern Euro-Mediterranean subregion. *Acta Zool. Bulg.* **63**, 105-108.
- Felsenstein J. 1973. Maximum-likelihood and minimum-steps method for estimating evolutionary trees. *Syst. Zool.* **22**, 240-249.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 294–299.
- Füreder L., Summerer M., Brandstätter A. 2009. Phylogeny and species composition of five European species of *Branchiobdella* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) reflect the biogeographic history of three endangered crayfish species. *J. Zool.* **279**, 164-172.
- Gelder S.R. 1996. A review of the taxonomic nomenclature and a checklist of the species of the Branchiobdellae (Annelida: Clitellata). *Proc. Biol. Soc. Washington* **109**, 653-663.

- Gelder S.R. 1999. Zoogeography of branchiobdellidans (Annelida) and temnocephalidans (Platyhelminthes) ectosymbiotic on freshwater crustaceans, and their reactions to one another *in vitro*. *Hydrobiologia* **406**, 21-31.
- Gelder S.R. 2004. Endemic ectosymbiotic branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) reported on three "export" species of North American crayfish (Crustacea: Astacoidea). *Freshwater Crayfish* **14**, 221-227.
- Gelder S.R. 2010. Annelida (Clitellata): Oligochaeta, Branchiobdellida, Hirudinida, and Acanthobdellida. U: Thorp J.H., Covich A.P. (ur.) Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Burlington, Academic Press/Elsevier, str. 385-410.
- Gelder S.R., Delmastro G.B., Ferraguti M. 1994. A report on branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and a taxonomic key to the species in northern Italy, including the first record of *Cambarincola mesochoreus* on the introduced American red swamp crayfish. *Boll. Zool.* **61**, 179-183.
- Gelder S.R., Delmastro G.B., Rayburn J.N. 1999. Distribution of native and exotic branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) on their respective crayfish hosts in northern Italy, with the first record of native *Branchiobdella* species on an exotic North American crayfish. *J. Limnol.* **58**, 20-24.
- Gelder S.R. i Siddall M.E. 2001. Phylogenetic assessment of the Branchiobdellidae (Annelida: Clitellata) using 18S rDNA and mitochondrial Cytochrome c Oxidase subunit I and morphological characters. *Zool. Scr.* **30**, 215-222.
- Gelder S.R. i Ohatka A. 2002. A Review of the Oriental Branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) with Reference to the Rediscovered Slide Collection of Prof. Hideji Yamaguchi. *Species Diversity* **7**, 333-344.
- Gelder S.R., Parpet J.F., Quaglio F. 2012. First report of two North American branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) or crayfish worms on signal crayfish in Europe with a discussion of similar introductions into Japan. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* **48**, 315–322.
- Georgevitch J. 1957. Contribution à la connaissance des aelosomatidés de la Yougoslavie. *Bull. Acad. Serbe Sci. Cl. Sci. Math. Nat.* **18**, 93-95.

- Goodnight C.J. 1940. The Branchiobdellidae (Oligochaeta) of North American crayfishes. Ill. Biol. Monogr. **3**, 1-75.
- Halanych K.M., Feldman R.A., Vrijenhoek R.C. 2001. Molecular evidence that *Sclerolinum brattstromi* is closely related to vestimentiferans, not to frenulate pogonophorans (Siboglinidae, Annelida). Biol. Bull. **201**, 65-75.
- Halgoš J. 1972. Beitrag zur kenntnis der Ektoparasitischen würmer der ordnung Branchiobdellida in der Slowakei (Annelida: Clitellata). Ac. Rer. Natur. Mus. Nat. Slov. **18**, 63-69.
- Hall B. G. 2007. Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual, Third Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland, str.173.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. **41**, 95-98.
- Harper D, 2010. Phylogeny. Online Etymology Dictionary 2013.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. **22**, 160–174.
- Holdich D.M., Ackefors H., Gherardi F., Rogers W.D., Skurdal J. 1999. Native and alien crayfish in Europe: Some conclusions. U: Gherardi F., Holdich D.M. (ur.) Crayfish in Europea as alien species. How to make the best of a bad situation?. AA Balkema, Brookfield, str. 281-292.
- Holt P.C. 1953 Characters of Systematic Importance in the family Branchiobdellidae (Oligochaeta). VA. J. Sci. **4**, 57-61.
- Holt P.C. 1965. The systematic position of the Branchiobdellidae (Annelida: Clitellata). Syst. Zool. **14**, 25-32.
- Holt P.C. 1977. A gill inhabiting new genus and species of the Branchiobdellida (Annelida:Clitellata). Proc. Biol. Soc. Washington **90**, 726-734.
- Holt P.C. 1986. Newly established families of the order Branchiobdellida (Annelida:Clitellata) with a synopsis of the genera. Proc. Biol. Soc. Washington **99**, 676-702.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics **17**, 754–755.

- Jennings J.B., Gelder S.R. 1979. Gut structure, feeding and digestion in the branchiobdellid oligochaete *Cambarincola macrodonta* Ellis 1912, an ectosymbiote of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Biol. Bull. **156**, 300–314.
- Kalafatić M. 1998. Osnove biološke evolucije. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Karaman S.M. 1967. Branchiobdellidae Jugoslavije (Annelida: Clitellata). Bul. Pun. Shken. Fak. Fil. Prisht. **4**, 39-63.
- Karaman S.M. 1970. Beitrag zur Kenntnis der europäischen Branchiobdelliden (Clitellata, Branchiobdellidea). Int. Rev. Hydrobiol. **55**, 325-333.
- Klobučar G., Maguire I., Gottstein S., Gelder S.R. 2006. Occurrence of Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) on freshwater crayfish in Croatia. Ann. Limnol. – Int. J. Lim. **42**, 251–260.
- Klobučar G., Podnar M., Jelić M., Franjević D., Faller M., Štambuk A., Gottstein S., Simić V., Maguire I. 2013. Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. Freshwater Biol. **58**, 1089-1105.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.R., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. ClustalW ad ClustalX version 2. Bioinformatics **23** (21), 2947-2948.
- Lewis S.D. 2002. *Pacifastacus*. U: Holdich D.M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell science, Oxford, str. 511-541.
- Li W.H. 1997. Molecular Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, str. 475.
- Maguire I., Gottstein-Matočec S. 2004. The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. Crustaceana **77**, 25-47.
- Maguire I., Klobučar G., Faller M., Machino Y., Kućinić M., Žužul M. 2006. Updates on the distribution of the white-clawed and the narrow-clawed crayfish in Croatia. Crayfish News **28**, 4-5.
- Maguire I., Jelić M., Klobučar G. 2011. Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. Knowl. Managt. Aquatic. Ecosyst. **401** (31) (doi: /10.1051/kmae/2011051).

- Martin P. 2001. On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta. Proc. R. Soc. Lond. **268** (doi: 10.1098/rspb.2001.1616).
- Martin P., Kaygorodova I., Sherbakov D.Y., Verheyen E. 2000. Rapidly evolving lineages impede the resolution of phylogenetic relationships among Clitellata (Annelida). Mol. Phylogenet. Evol. **15**, 355–368.
- Matoničkin I., Habdija I., Primc-Habdija B. 1999. Beskralješnjaci Biologija viših avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb.
- Mau B., Newton M., Larget B. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. Biometrics **55**, 1-12.
- Moszyński A. 1938. Oligochetes parasites de l'ecrevisse (*Potamobius astacus* 371 L.) de la Yougoslavie. Bull. Soc. Sci. Skopje **18**, 69-75.
- Nesemann H. 1994. Die Krebssegel im Gebiet der Oberen Donau (Österreich, Deutschland) mit Bestimmungsschlüssel zu den europäischen Arten (Clitellata, Branchiobdellida). Lauterbornia H. **19**, 79-93.
- Oberkofler B., Quaglio F., Füreder L., Fioravanti M.L., Giannetto S., Morolli C., Minelli G. 2002. Species of Branchiobdellidae (Annelida) on freshwater crayfish in South Tyrol (Northern Italy). Bull. Fr. Pêche Piscic. **367**, 777-784.
- Palumbi S.R., Martin S.A., Romano S., McMillan W.O., Stice L., Grabowski G. 1991. The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.
- Pierantoni U. 1912. Monografia dei Discodrilidae. Ann. Mus. Zool. Univ. Napoli **3**, 1-28.
- Pop V. 1965. Systematischen Revision der europäischen Branchiobdelliden (Oligochaeta). Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere **92**, 219-238.
- Quaglio F., Fioravanti M.L., Gelder S.R., Giannetto S., Trentini M., Nobile L., Maxia M., Morolli C. 2002. Infestation of the branchiobdellidan, *Xironogiton victoriensis* (Annelida, Clitellata), on the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from Auenbachl Creek, Alto Adige/Süd Tyrol, Italy. Freshwater Crayfish **13**, 274-279.
- Rambaut A. 2012. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: FigTree [Online].

- Rosewarne P.J., Mortimer R.J.G., Dunn A.M. 2012. Branchiobdellidan infestation on endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in the UK. *Parasitology* **139**, 774-780.
- Scalici M., Di Gulio A., Gilbertini G. 2013. Biological and morphological aspects of *Branchiobdella italica* (Annelida: Clitellata) in a native crayfish population of central Italy. *Ital. J. Zoo.* **77**, 410-418.
- Schulman A.H., Flavell A.J., Ellis T.H.N. 2004. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol. Biol.* **260**, 145-173.
- Siddall M.E., Apakupakul K., Burreson E.M., Coates K.A., Erséus C., Gelder S.R., Källersjö M., Trapido-Rosenthal H. 2001. Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans, and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes. *Mol. Phyl. Evol.* **21**, 346-351.
- Subchev M.A. 1978. A new branchiobdellid - *Branchiobdella kozarovi* sp.n. (Oligochaeta, Branchiobdellidae) from Bulgaria. *Acta Zool. Bulg.* **9**, 78-80.
- Subchev M.A. 2011. First Record of *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Albania and an Overview of the Geographic Distribution of *Branchiobdella hexodonta* Gruber, 1882 in Europe. *Acta zool. bulg.* **63**, 109-112.
- Subchev M.A., Stanimirova L.S. 1997. Distribution of freshwater crayfishes (Crustacea: Astacidae) and the epibionts of the genus *Branchiobdella* (Annelida: Branchiobdellae), *Hystricosoma chappuisi* Michealsen, 1926 (Annelida, Oligochaeta) and *Nitrocrella divaricata* (Crustacea: Copepoda) in Bulgaria. *Hist. Nat. Bulg.* **9**, 5-18.
- Subchev M., Koutrakis E., Perdikaris C. 2007. Crayfish epibionts *Branchiobdella* sp. and *Hystricosoma chappuisi* (Annelida: Clitellata) in Greece. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **387**, 59-66.
- Šundić D. i Radujković B. 2012. Study on freshwater Oligochaeta of Montenegro and their use as indicators in water quality assessment. *Natura Montenegrina* **11**, 117-383.
- Swofford D.L. 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0. beta10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.

- Tzgaloff A., Myers A.M. 1986. Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 249–285.
- Vogt, G. 1999. Diseases of European freshwater crayfish , with particular emphasis on interspecific transmission of pathogens. U: Gherardi F., Holdich D.M. (ur.) *Crayfish in Europea as alien species. How to make the best of a bad situation?*. AA Balkema, Brookfield, str. 87-103.
- Weigl A.M. 1994. Ultrastructure of the adhesive organs in branchiobdellids (Annelida: Clitellata). *Trans. Am. Microsc. Soc.* **113**, 276-301.
- Williams B.W., Gelder S.R., Proctor H.C., Coltman D.W. 2013. Molecular phylogeny of North American Branchiobdellida (Annelida: Clitellata). *Mol. Phylogenet. Evol.* **66**, 30-42.
- Young W. 1966. Ecological studies of the Branchiobdellidae (Oligochaeta). *Ecology* **47**, 571–578.
- Zuckerandl E., Pauling L. 1965. Molecules as Documents of Evolutionary History. *J. Theoret. Biol.* **8**, 357-366.

8. PRILOZI

Prilog 1. Prikaz dijela višestrukog sravnjenja sekvenci za gen za COI.

Prilog 2. Prikaz dijela višestrukog sravnjenja sekvenci za gen za 16S rRNA.

Prilog 3. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za COI.

Prilog 4. MP filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za COI.

Prilog 5. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za COI

Prilog 6. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA.

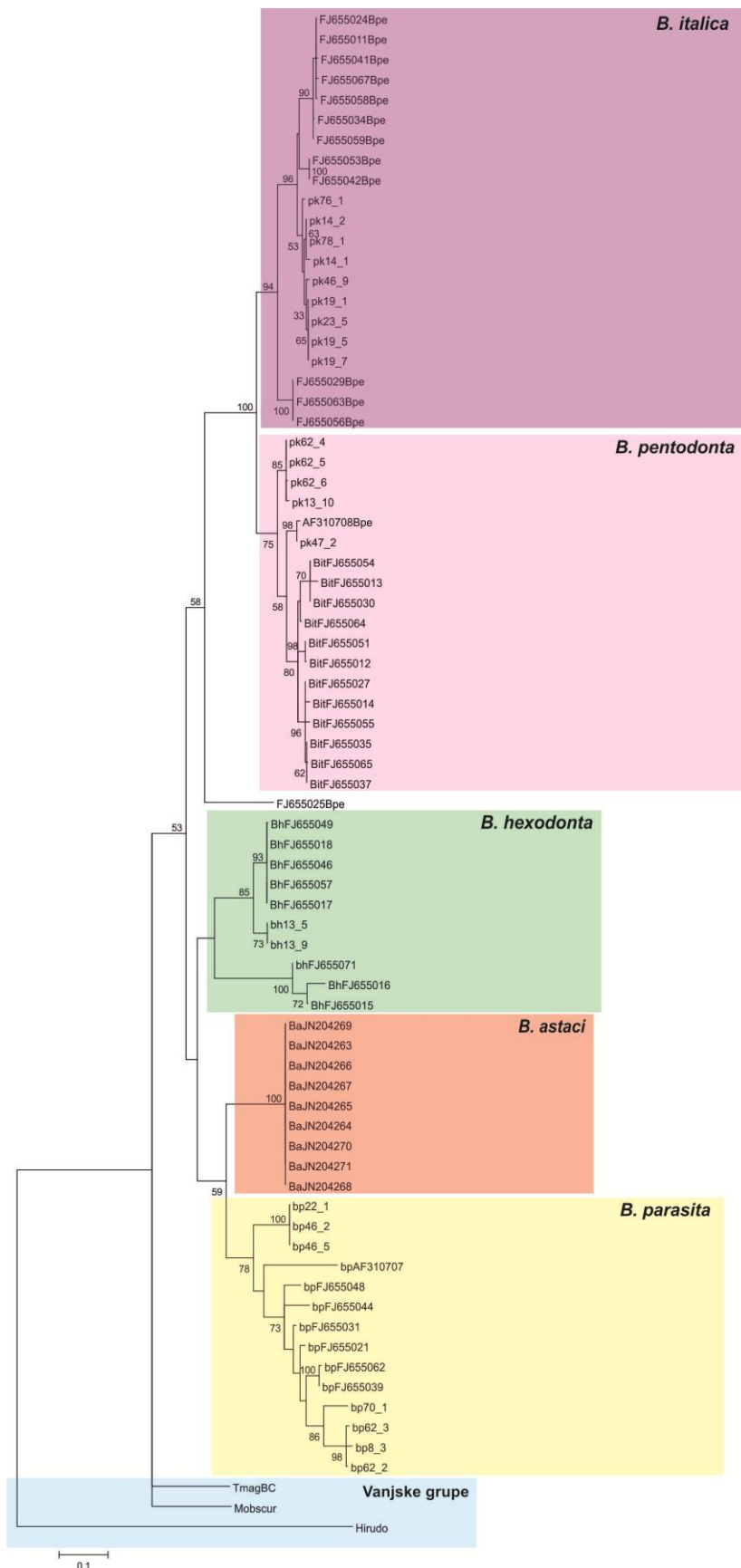
Prilog 7. MP filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA.

Prilog 8. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA.

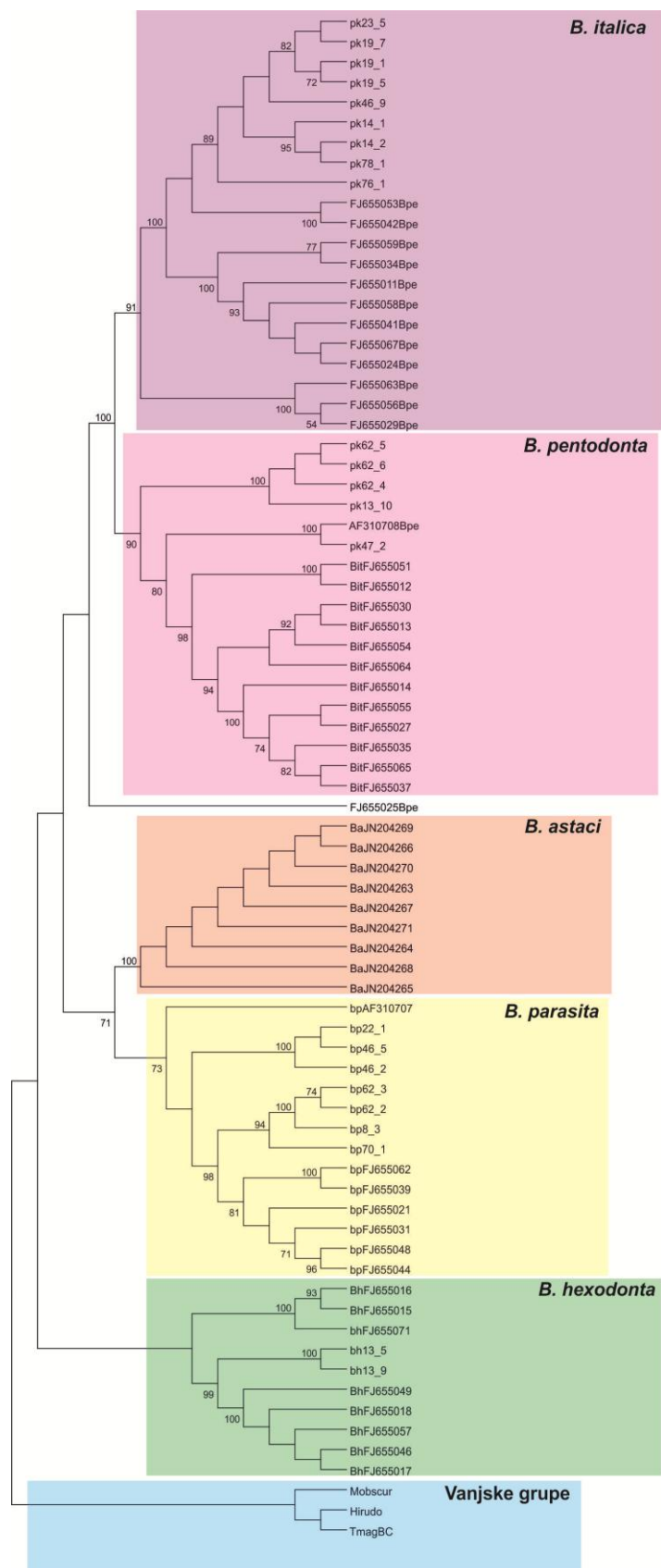
Prilog 2. Prikaz dijela višestrukog sravnjenja sekvenci za gen za 16S rRNA.

[illegible]

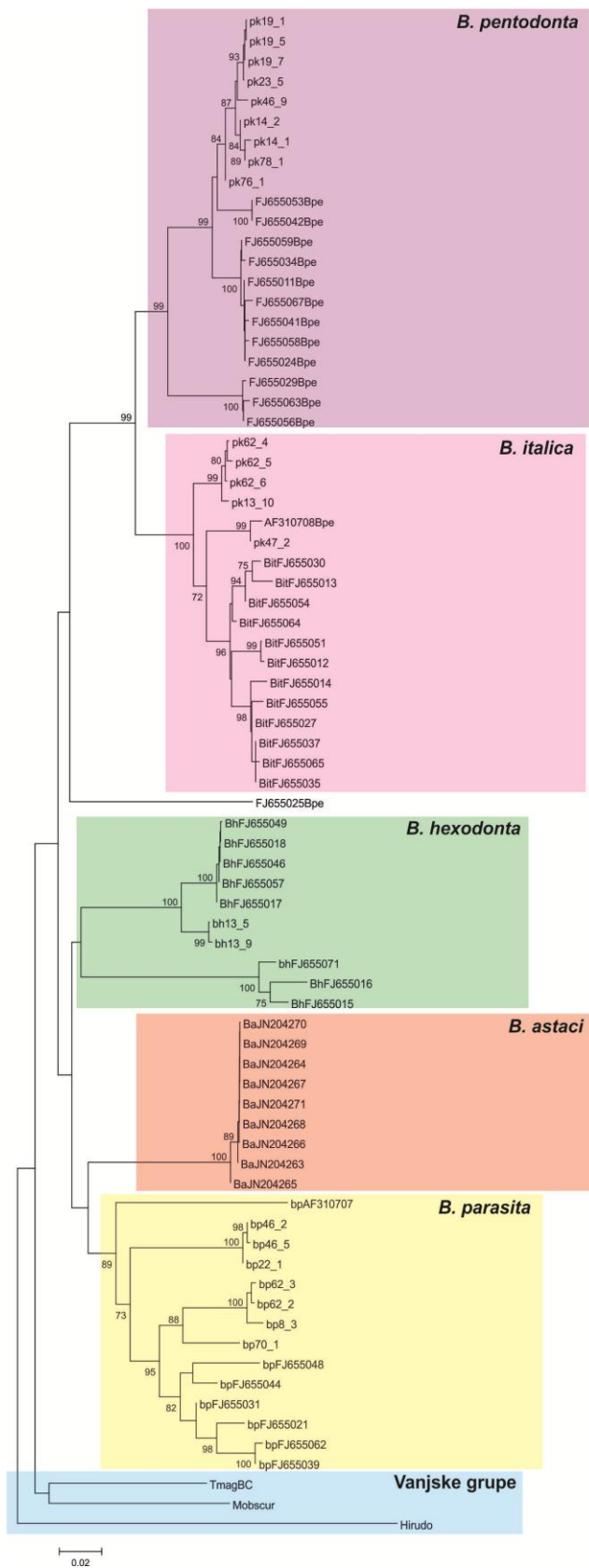
Prilog 3. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za COI. Na granama su prikazane samo vrijednosti *bootstrap* podrške iznad 50.



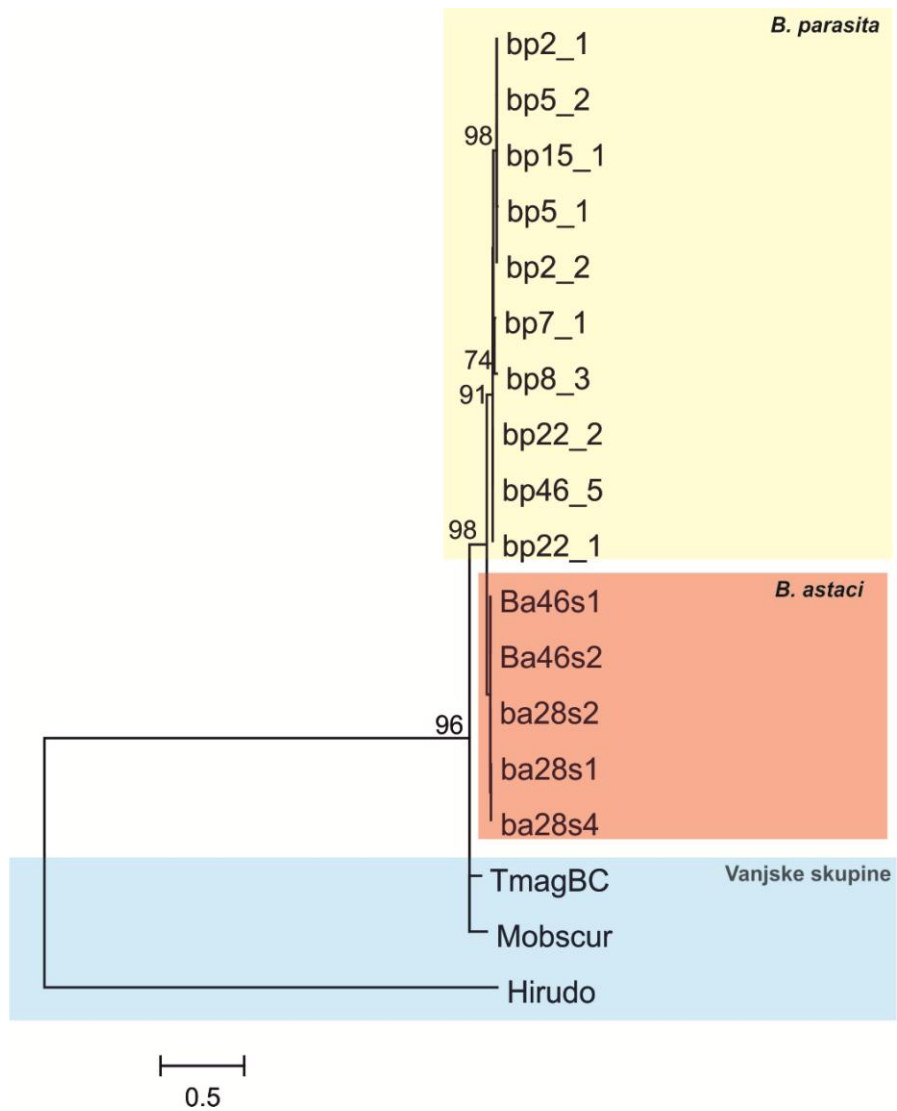
Prilog 4. MP filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za COI. Na granama su prikazane samo vrijednosti *bootstrap* podrške iznad 70.



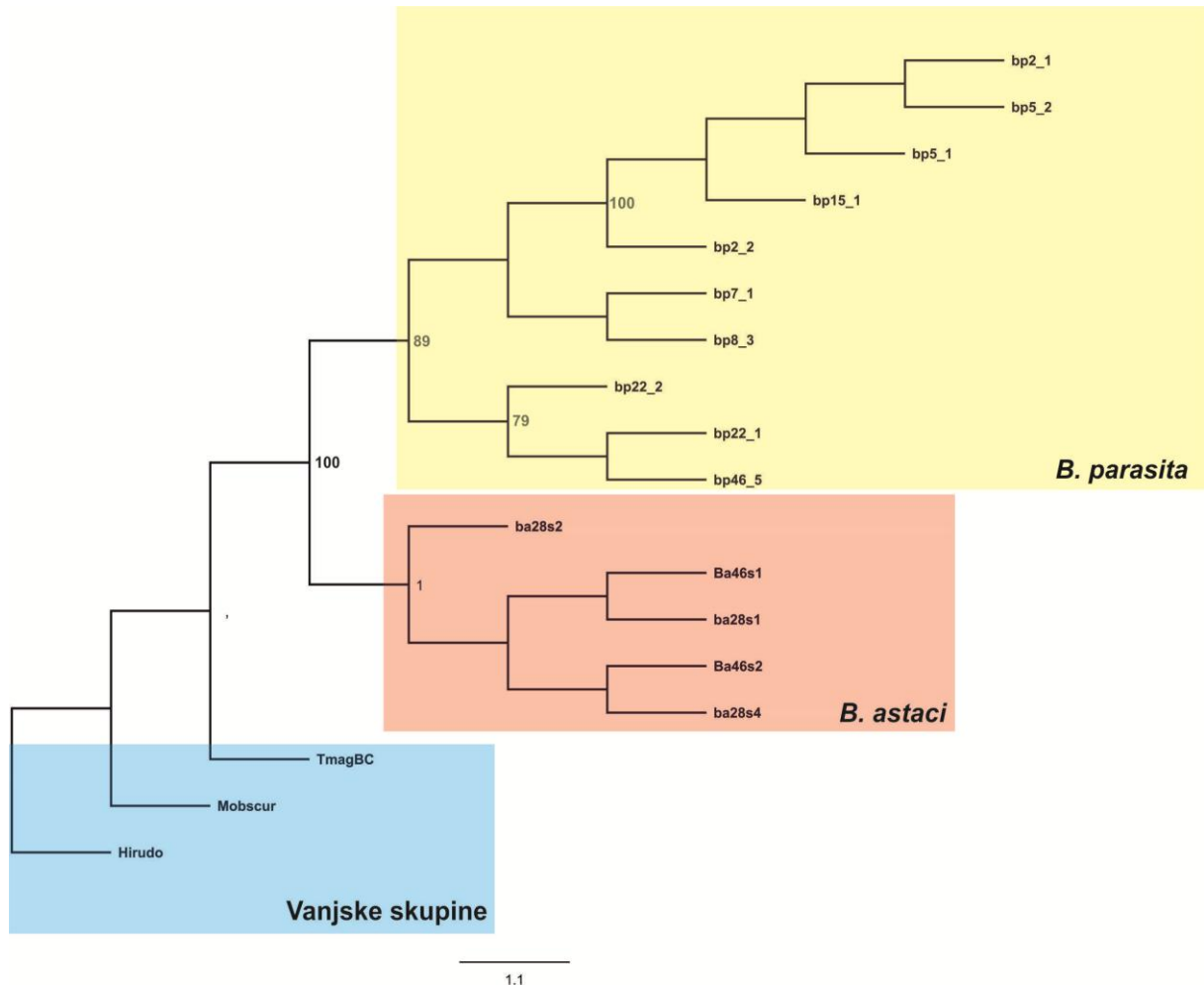
Prilog 5. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za COI. Na granama su prikazane samo vrijednosti *bootstrap* podrške iznad 70.



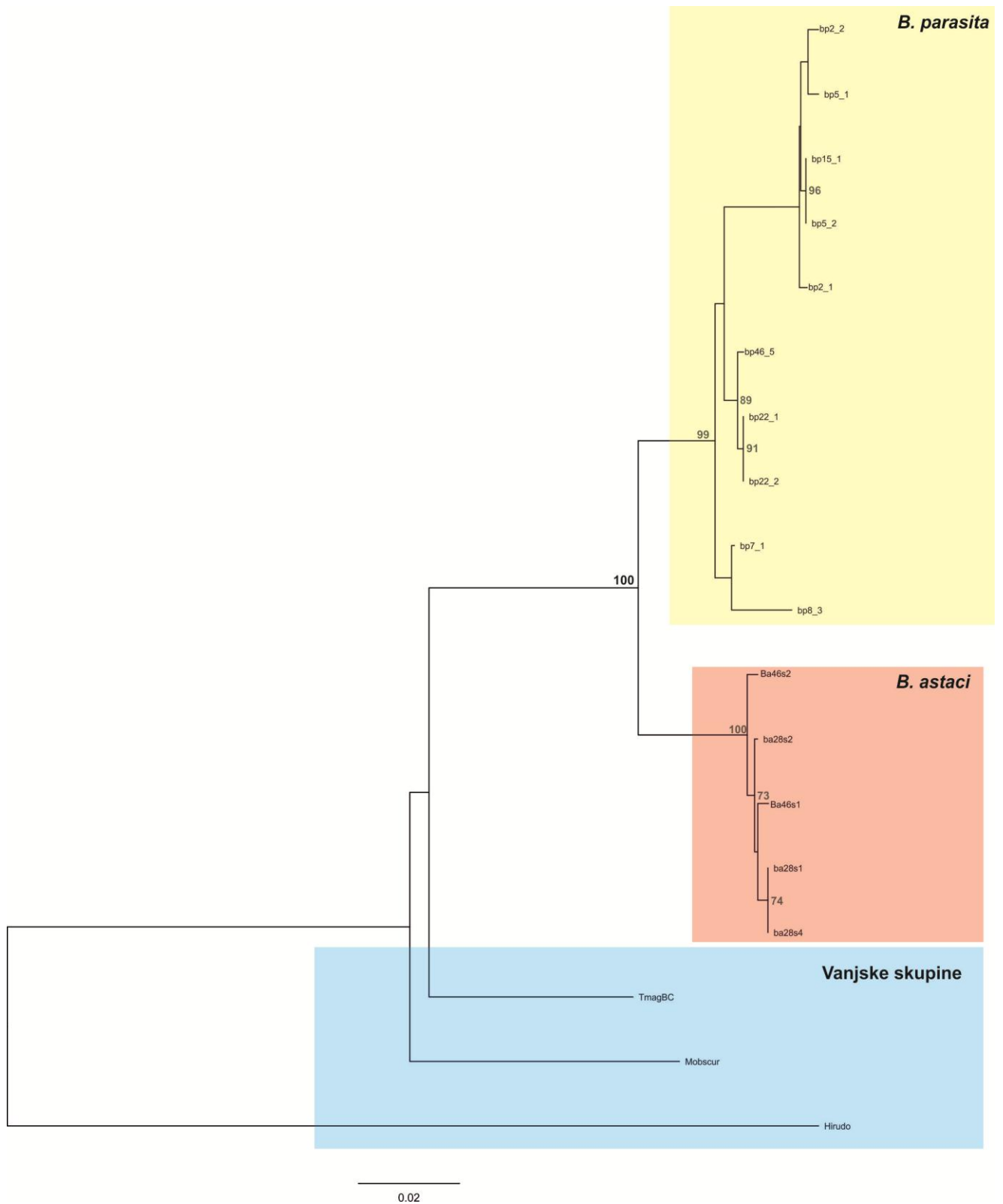
Prilog 6. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA. Na granama su prikazane samo vrijednosti *bootstrap* podrške iznad 50.



Prilog 7. MP filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA. Na granama su prikazane samo vrijednosti *bootstrap* podrške iznad 70.



Prilog 8. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom gena za 16S rRNA. Na granama su prikazane samo vrijednosti *bootstrap* podrške iznad 70.



ŽIVOTOPIS

Ivana Šarić

- Škrbljeva 21, 10 000 Zagreb, Hrvatska
- 098 9545702
- ivana.saric@rocketmail.com

Datum i mjesto rođenja:

- 29.6.1989., Zagreb

Završeno obrazovanje:

- Preddiplomski studij biologije; Biološki odsjek; Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Privatna klasična gimnazija s pravom javnosti, Zagreb
- Osnovna škola Augusta Harambašića, Zagreb

Fakultetski angažman:

- Demonstratorica na Botaničkom zavodu iz kolegija „Morfologija i anatomija bilja“ (ak. god. 2009./2010.)
- Demonstratorica na Zoologijskom zavodu iz kolegija „Opća zoologija“ (ak. god. 2013./2014.)
- Pohvalnica za izuzetni uspjeh u studiju od vijeća PMF-a (2013. godina)

Vannastavni program:

- Član Udruge studenata biologije - BIUS (2010.-2014.)
- Voditeljica Sekcije za mekušce Udruge studenata biologije – BIUS (2012./2013.)
- Sudjelovanje u Noći biologije (2011. i 2012.)
- Mentor na Ljetnoj tvornici znanosti (2009.)

Međunarodno priznate razmjene:

- Zimski semestar ak. god. 2012./2013. proveden na Sveučilištu u Beču; Erasmus program razmjene

Međunarodni kongresi:

- Craycro kongres, organizacijski odbor, rujan 2013. godine, Rovinj